

Targeted RNase:
Humane Antikörper-RNase-Fusionen zur Bekämpfung von CD30⁺ Lymphomen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von: Christian Menzel
aus: Wolfsburg

1. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referentin: Professor Dr. Petra Dersch
eingereicht am: 19.12.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.04.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag:

Menzel C., Konthur Z., Dürkop H., Dübel S., Jostock T.: Targeting human RNase to CD30+ lymphomas. PEGS: Protein Engineering Summit April, 2006

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dübel gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung und Förderung.

Frau Prof. Dr. Dersch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Mendel bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Der gesamten Arbeitsgruppe, vor allem Dr. Thomas Jostock sowie Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann danke ich für ihre Unterstützung und fortwährende Bereitschaft zur Diskussion sowie Korrektur der vorliegenden Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Doris Meier für ihre stete Hilfsbereitschaft, den Erfahrungsaustausch und die Wissensvermittlung insbesondere bei zellbiologischen Thematiken. Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei allen weiteren Kollegen des Institutes für ihre Kollegialität und Unterstützung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Zoltan Konthur (MPI, Berlin) und den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Dürkop (Charite, Berlin; FACS) und Prof. Dr. Heinz (GBF, Braunschweig; N-terminale Sequenzierung) für ihre Unterstützung.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Cynthia und meiner Familie für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	11
1.1	Antikörper und rekombinante Antikörper	11
1.2	Generierung monoklonaler Antikörper	14
1.2.1	Antikörper-Display-Verfahren	15
1.2.2	Transgene Tiere	15
1.3	Antikörperbasierte Krebstherapien	16
1.3.1	Unkonjugierte monoklonale Antikörper	18
1.3.1.1	ADCC / ADCP	18
1.3.1.2	CDC	19
1.3.1.3	Modulation von Signaltransduktionswegen.....	20
1.3.2	Antikörperkonjugate	21
1.3.2.1	Radioimmunotherapie	21
1.3.2.2	Antikörpertoxine	22
1.3.2.3	“Antibody directed enzyme prodrug therapy” (ADEPT)	23
1.3.2.4	Antikörper-RNase-Konjugate	24
1.4	CD30 als Tumormarker bei Lymphomen	25
1.4.1	Charakteristische Merkmale von CD30	25
1.4.2	Hodgkin-Lymphome (HL).....	27
1.4.3	Non-Hodgkin Lymphome (NHL)	29
1.5	Zielsetzung.....	29
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Material	31
2.1.1	Pro- und eukaryotische Stämme	31
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	31
2.1.1.2	<i>Pichia pastoris</i>	31
2.1.1.3	Mammalia-Zelllinien	31
2.1.2	Plasmide	32
2.1.3	Oligonukleotide	32
2.1.4	Antikörper und Cytokine	33
2.1.5	Chemikalien und Enzyme	33
2.1.6	Kit-Systeme	34
2.1.7	Laborgeräte und Zubehör	34
2.1.8	Nährmedien und Zusätze	35
2.1.9	Sonstiges	35
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden	36
2.2.1.1	Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	36
2.2.1.2	Kultivierung und Lagerung von <i>Pichia pastoris</i>	36
2.2.1.3	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	36
2.2.1.4	Herstellung kompetenter <i>P. pastoris</i> -Zellen	36
2.2.1.5	Amplifikation von DNA mittels PCR	37
2.2.1.6	Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten	37
2.2.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.2.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA	38
2.2.1.9	Reinigung und Präzipitation von DNA.....	38
2.2.1.10	Restriktionsverdau	38
2.2.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.2.1.12	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.2.1.13	Transformation von <i>P.pastoris</i>	39
2.2.1.14	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	40
2.2.1.15	DNA-Sequenzierung	40

2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	41
2.2.2.1	ProteinA-Affinitätschromatographie	41
2.2.2.2	ProteinL-Affinitätschromatographie.....	41
2.2.2.3	Gelfiltration.....	41
2.2.2.4	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	42
2.2.2.5	Oberflächen-Plasmon-Resonanz.....	42
2.2.2.6	Antigen-ELISA	42
2.2.2.7	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ...	43
2.2.2.8	Coomassie-Blue-Färbung	43
2.2.2.9	Silberfärbung.....	44
2.2.2.10	Western-Blot	44
2.2.2.11	N-terminale Sequenzierung	44
2.2.2.12	RNase Aktivitätsmessungen	45
2.2.3	Zellbiologische Methoden	45
2.2.3.1	Kultivierung und Lagerung von Säugerzellen	45
2.2.3.2	Zelldichtebestimmung	46
2.2.3.3	Transfektion von Säugerzellen	46
2.2.3.4	Durchflusszytometrie	46
2.2.3.5	ADCC.....	47
2.2.3.5.1	Isolierung und Aktivierung von Effektorzellen / PBMCs	47
2.2.3.5.2	ADCC-Analyse	47
2.2.3.6	Internalisierungsassay der <i>Targeted RNase</i> mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.....	48
2.2.3.7	Proliferations-Assay.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Konstruktion CD30 spezifischer Antikörperformate und <i>Targeted RNasen</i> Fusionsproteine	50
3.2	Klonierung von CD30 und Expression der extrazellulären Domäne als CD30-Fc Fusionsprotein	53
3.3	Expression der verschiedenen Antikörperformate und TR-Fusionsproteine	54
3.4	CD30-Antigen-ELISA	55
3.5	Aufreinigung der Antikörperformate und TR-Fusionsproteine	56
3.6	Kontrolle der aufgereinigten Antikörperformate und TR-Fusionsproteine	57
3.7	Charakterisierung der Antikörperformate und TR-Fusionsproteine	58
3.7.1	Gelfiltration.....	58
3.7.2	Bestimmung der Affinität (K_D), k_{on} - und k_{off} -Raten mittels „ <i>Surface Plasmon</i> <i>Resonance</i> “	59
3.7.3	Nachweis der Erkennung von nativen CD30 auf Lymphomzelllinien mittels Durchflusszytometrie-Messung	61
3.7.4	<i>In vitro</i> RNase-Aktivität	63
3.7.5	CD30-rezeptorvermittelte Endozytose von <i>Targeted RNase</i>	64
3.7.6	<i>Targeted RNase</i> vermittelte Proliferationsinhibition von CD30 ⁺ Lymphomen.....	66
3.7.7	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität als weitere Effektorfunktion	67
3.8	Design neuer Antikörperformate für TR-Fusionen	68
3.8.1	Klonierung, Expression und Charakterisierung des D1.3-scFabΔC	69
3.8.2	Klonierung, Expression und Charakterisierung des D1.3-sclgGs.....	71
4	Diskussion	75
4.1	Aufbau des Antikörper-RNase-Fusionskonstrukts	76
4.2	<i>Targeted RNase</i> als Krebstherapie für internalisierende Tumormarker	81
4.3	Neue „ <i>single chain</i> “ Antikörperformate - scFabΔC und sclgG	83
4.4	Ausblick.....	87
5	Zusammenfassung	89
	Summary	90

6	Literatur	91
7	Anhang	102
7.1	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	102
7.1.1	Medien	102
7.1.2	Antibiotika	102
7.1.3	Standardpuffer und -lösungen	103
7.2	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	103
7.2.1	Kompetente Zellen.....	103
7.2.2	Agarosegelelektrophorese	104
7.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	104
7.3.1	ProteinA-Affinitätschromatographie	104
7.3.2	ProteinL-Affinitätschromatographie	104
7.3.3	SDS-PAGE	104
7.3.4	Coomassie-Färbung	105
7.3.5	Western Blot / Immunostaining	105
7.3.6	ELISA.....	105

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1.1:	Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G, eines scFv- und eines Fab-Antikörperfragmentes.	13
Abb. 1.2:	Wirkungsmechanismen von Antikörpern in der Krebstherapie.	18
Abb. 1.3:	Funktionsmechanismus der <i>Targeted RNase</i>	25
Abb. 1.4:	Schematischer Aufbau des murinen bzw. humanen CD30.	26
Abb. 3.1:	Schematischer Aufbau der CD30 spezifischen Antikörperformate und TR.	50
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pPICZalphaA (<i>P. pastoris</i>) und pCMV-myc-ER (Säugerzellen) und des Aufbaus der Antikörpergenkonstrukte.	51
Abb. 3.3:	DNA-Agarosegel der Zweitstrangsynthese und Amplifikation der cDNA von CD30 (extrazelluläre Domäne).	54
Abb. 3.4:	Analyse des aufgereinigten rekombinanten CD30-Fc-Fusionsproteins.	54
Abb. 3.5:	ELISA mit CD30-Fc Antigen zur Analyse von Kulturüberständen der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte.	55
Abb. 3.6:	SDS-PAGE der exprimierten und aufgereinigten Antikörper und TR-Konstrukte.	56
Abb. 3.7:	Immunoblot nach Aufreinigung von α CD30scFv-Fc-RNase und scFv-RNase.	57
Abb. 3.9:	Präparative Gelfiltration von ProteinL-gereinigtem scFv-Fragment (600 μ g/mL).	58
Abb. 3.11:	Overlay-Plots der am BIAcore 2000 gemessenen Sensogramme der verschiedenen CD30 spezifischen Antikörperformate und TR-Konstrukte.	60
Abb. 3.12:	Durchflusszytometrische Messung zur Ermittlung der Bindungseigenschaften der verschiedenen Antikörperformate und TR-Konstrukte.	61
Abb. 3.13:	Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Bindungseigenschaften von α CD30scFv-Fc und α CD30scFv-Fc-RNase an natives CD30.	62
Abb. 3.14:	Bestimmung der RNase-Aktivität durch <i>in vitro</i> -Translation von Luciferase-mRNA und Messung des Lumineszenzsignals.	63
Abb. 3.15:	Rezeptorvermittelte Internalisierung der <i>Targeted RNase</i> (α CD30-scFv-Fc-RNase) von CD30 ⁺ Karpas-Zellen.	65
Abb. 3.16:	Inhibition der Proliferation von CD30 positiven Karpas Zellen.	66
Abb. 3.17:	Bestimmung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität vermittelt von α CD30(4E3)scFv-Fc-RNase und α CD30(4E3)scFv-Fc.	68
Abb. 3.19:	SDS-PAGE und Immunoblot des ProteinL aufgereinigten D1.3-scFab Δ C.	70
Abb. 3.20:	Analytische Gelfiltration des ProteinL gereinigten D1.3-scFab Δ C (1 mg/mL).	70
Abb. 3.21:	Antigen-ELISA mit Lysozym zur Funktionsbestimmung der D1.3-scFab.	71
Abb. 3.22:	SDS-PAGE und Immunoblot des ProteinA aufgereinigten D1.3-sclgGs.	72
Abb. 3.23:	Analytische Gelfiltration des ProteinA gereinigten D1.3-sclgG.	73
Abb. 3.24:	Antigen-ELISA mit Lysozym zur Funktionsbestimmung der D1.3-sclgG Monomere und größerer Aggregate.	74
Abb. 3.25:	Overlay-Plot der am BIAcore2000 gemessenen Sensogramme von D1.3-sclgG (Monomerfraktion).	74

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1.1:	Übersicht der für die Krebstherapie zugelassenen und in der Forschung befindlichen Antikörper und Antikörperkonjugate.	17
Tab. 3.1:	Übersicht der ermittelten Affinitäten (K_D), Assoziationsraten (k_{on}) und Dissoziationsraten (k_{off}) der Antikörperformate und TR.	59

α :	anti
Abb.:	Abbildung
ADCC:	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
ADCP:	<i>Antibody Dependent Cellular Phagocytosis</i> (antikörperabhängige zelluläre Phagozytose)
ADEPT:	<i>Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
ADP:	Adenosindiphosphat
AICC:	<i>Antibody Independent Cellular Cytotoxicity</i> (antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität)
ALCL:	Anaplastic Large Cell Lymphoma
AP:	alkalische Phosphatase
ATL:	adulte T-cell Lymphoma
BCIP:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BEACOPP:	Bleomycin-Etoposidphosphat-Adriamycin-Cyclophosphamid-Oncovin-Procarbazine-Prednison
BiP:	Binding Protein
BSA:	Bovine Serum Albumin
CD:	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC:	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CMV:	Cytomegalovirus
cDNA:	<i>coding</i> DNA (kodierende DNA)
CDR:	<i>Complementarity Determining Region</i> (komplementaritätsbestimmende Region)
C _H :	konstante Region der schweren Ketten
C _L :	konstante Region der leichten Kette
CRD:	cysteinreiche Domäne
CTL:	Cytotoxic T-Lymphocyte (zytotoxische T-Lymphozyten)
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DT:	Diphtheria-Toxin
EBV:	Epstein-Barr-Virus
EGFR:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ER:	endoplasmatisches Retikulum
ETA:	Endotoxin A
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ES:	embryonale Stammzellen
Fab:	<i>Fragment antigen binding</i>
E/T:	Effektor zu Targetzellen Verhältnis (hier: CD30 ⁺ bzw. CD30 ⁻ Zellen zu PBMCs)
FACS:	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc:	<i>Fragment crystallizable</i>
FcRn:	neonataler Fc-Rezeptor
FCS:	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC:	Fluorescein-Isothiocyanat
FR:	Framework Region (Gerüstregion)
HAMA:	<i>Human Anti Mouse Antibody</i>
HACA:	<i>Human Anti Chimeric Antibody</i>
HEK:	Human Embryonic Kidney
HL:	Hodgkin Lymphom
HRP:	Horseradish Peroxidase
IC ₅₀ :	inhibitorische Konzentration 50%
Ig:	Immunglobulin
IgH:	Immunglobulin schwere Kette
IT:	Immunotoxin
kb:	kilo Basenpaare
kDa:	kilo Dalton

K_D :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
k_{on} :	Assoziationsrate
k_{off} :	Dissoziationsrate
LDH:	Lactat-Dehydrogenase
mAk:	monoklonaler Antikörper
mRNA:	messenger RNA
NBT:	Nitro-Blau-Tetrazoliumchloride
NHL:	Non-Hodgkin Lymphoma
NK:	Natürliche Killerzelle
OD:	optische Dichte
PBMC:	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE:	Phycoerythrin
RI:	RNase-Inhibitor
RIP:	Ribosomen inaktivierendes Protein
RNase:	Ribonuklease
rpm:	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT:	Raumtemperatur
scFab:	<i>single chain Fab</i>
scFv:	<i>single chain Fragment variable</i>
scFv-Fc:	<i>single chain Fragment variable-Fragment crystallizable</i>
sclgG:	<i>single chain Immunglobulin G</i>
SPR:	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
SV40:	Simian Virus 40
Tab.:	Tabelle
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
TR:	<i>Targeted RNase</i>
ü.N.:	über Nacht
V_H :	<i>variable domain heavy chain</i> (variable Domäne schwere Kette)
V_L :	<i>variable domain light chain</i> (variable Domäne leichte Kette)
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
YAC:	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

1 Einleitung

Bereits im 19. Jahrhundert sprach Paul Ehrlich von magischen Kugeln als Substanzen, die sich spezifisch gegen Krankheitserreger richten und beschrieb somit u.a. monoklonale Antikörper (mAk), die auf dem heutigen Pharmamarkt ein an Bedeutung stark zunehmendes Segment darstellen. Gegenwärtig stellen mAks mehr als 16% aller neuen biologischen Wirkstoffe in der klinischen Entwicklung dar. Zur Zeit sind 18 mAk in den USA zugelassen und weitere 28 befinden sich in der klinischen Phase III. Ihr Potential als zukünftige „Blockbuster“ wird von einem geschätzten Gesamtumsatz für mAks von 15 Mrd. US \$ im Jahr 2005 bzw. jährlichen Erlösen von jeweils weit über 1 Mrd. US \$ für Infliximab (Remicade), Bevacizumab (Avastin) und Rituximab (Rituxin) untermauert. Insgesamt wird bis zum Jahr 2010 ein Wachstum der Erlöse für therapeutische mAks auf bis zu 30 Mrd. US \$ prognostiziert. (PhRMA, Biotechnologiereport Ernst&Young, und Drug Research/France, 2006).

1.1 Antikörper und rekombinante Antikörper

Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz vor und die Abwehr von pathogenen Fremdkörpern. Dabei wird zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität unterschieden. Antikörper, die zu der Immunglobulin-Superfamilie gehören, sind als Plasmaproteine Bestandteil der adaptiven, humoralen Immunität. Ihre Produktion erfolgt in Plasmazellen, ausdifferenzierten B-Lymphozyten, deren Reifungsprozess durch den Kontakt auf der Oberfläche befindlicher Antikörper mit deren Antigen induziert wird. Der Entstehungsprozess von Vorläuferzellen der B-Lymphozyten zu Plasmazellen umfasst den Vorgang der klonalen Deletion von autoreaktiven unreifen Lymphozyten sowie den Prozess der klonalen Selektion, der die Reifung des naiven Lymphozyten nach Antigenkontakt beinhaltet. Als klonale Expansion ist die weitere Proliferation einer Plasmazelle definiert. Die Aufgabe der Antikörper ist die spezifische Erkennung und Bindung des Antigens und dessen Markierung als Fremdkörper für das Immunsystem. Nachfolgende Immunreaktionen zur Bekämpfung des Pathogens umfassen abhängig von der Art und Lokalisation des Antigens die Aktivierung des Komplementsystems, die Phagozytose des Antikörper-Antigenkomplexes nach Opsonierung oder anderweitige Immunantworten, wie die Neutralisation von Viren oder Toxinen (Janeway *et al.* 2002).

Die Gruppe der Immunglobuline (Ig) ist in 5 Hauptklassen (Isotypen) eingeteilt, die z.T. wiederum in Subklassen unterteilt sind. Die Hauptisotypen unterteilen sich in IgA, IgD, IgE,

IgG und IgM, wobei sich im Menschen IgA und IgG weiter in IgA₁ und IgA₂ bzw. IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ aufteilen. Immunglobuline der Klasse M formen Pentamere, IgAs bilden sowohl Di- als auch Monomere aus, wohingegen alle übrigen Isotypen als Monomere präsent sind. Die Isotypendifferenzierung resultiert aus den unterschiedlichen schweren Ketten. Sie führt zu charakteristischen Unterschieden in Anzahl und Lokalisation von Glykosylierungen, Disulfidbrücken sowie konstanten Domänen. IgE und IgM verfügen anstelle einer Gelenkregion (hinge) über eine zusätzliche konstante Domäne. Der Isotyp eines Antikörpers entscheidet über die Art der von ihm ausgelösten Immunantwort.

Die Struktur bzw. Grundeinheit der Immunglobuline ist dabei hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, bestehend aus jeweils vier Polypeptidketten in Form zweier schwerer und zweier leichter Ketten, konserviert. Die schweren Ketten werden entsprechend der Hauptklassen unterschieden, wohingegen bei leichten Ketten nach Lambda- und Kappa-Ketten differenziert wird.

IgGs gehören mit nahezu 80% zu den häufigsten Igs im Plasma. Ihre leichten Ketten bestehen aus zwei Domänen: der variablen leichten Kette (V_L) und der konstanten leichten Kette (C_L), mit einer molekularen Masse von jeweils ~25kDa. Die leichte Kette ist über eine in der C_L-Domäne vorhandene intermolekulare Disulfidbrücke mit der konstanten C_H1-Domäne der jeweiligen schweren Ketten verbunden. Die schweren Ketten, mit einer molekularen Masse von je 50 kDa, bestehen ebenfalls aus einer variablen Domäne (V_H), an die sich am carboxyterminalen Ende drei konstante Domänen (C_H1-C_H2-C_H3) anschließen. Zusätzliche Flexibilität ist durch die zwischen C_H1 und C_H2 lokalisierte Gelenkregion (hinge-Region) gegeben, die zwei oder mehr (abhängig vom Isotyp) intermolekulare Disulfidbrücken für eine kovalente Verknüpfung zwischen den schweren Ketten sorgen. Die konstanten Domänen C_H2 und C_H3 werden auch als Fc-Domäne des Antikörpers bezeichnet (Abb.1.1).

Die Spezifität eines Antikörpers wird durch sechs hypervariable Bereiche, die sog. komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs), festgelegt. Sie sind ein Bestandteil der variablen leichten und schweren Ketten (V_L und V_H), die sich jeweils in vier Bereiche geringerer Variabilität (*Framework*-Regionen: FR1-FR4 jeweils in V_H bzw. V_L) und drei hypervariable Bereiche (CDR: L1, L2, L3 bei V_L bzw. H1, H2, H3 bei V_H) unterteilen. Framework-Regionen, auch als Gerüstregionen bezeichnet, bilden β -Faltblattstrukturen aus und stellen dadurch die strukturelle Basis der variablen Domänen bereit. Die CDRs selbst liegen im gefalteten Protein dicht beieinander und bilden meistens den Bereich, der mit dem Antigen bzw. dessen Epitop in Kontakt tritt. Die Gesamtheit der CDRs bildet das Paratop eines Antikörpers.

Neben der durch die variablen Regionen vermittelten Spezifität ist die konstante Region der Antikörper für deren Rolle im Immunsystem von Bedeutung. Die zur Komplementaktivierung

und Phagozytose notwendigen Domänen der konstanten Region sind hinge-Region, C_{H2} und C_{H3} der schweren Kette. Sie sind verantwortlich für die Bindung an Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Natürlichen Killerzellen, sowie für die Bindung von C1q zur Initiation des klassischen Komplementweges (Kap.1.3.1).

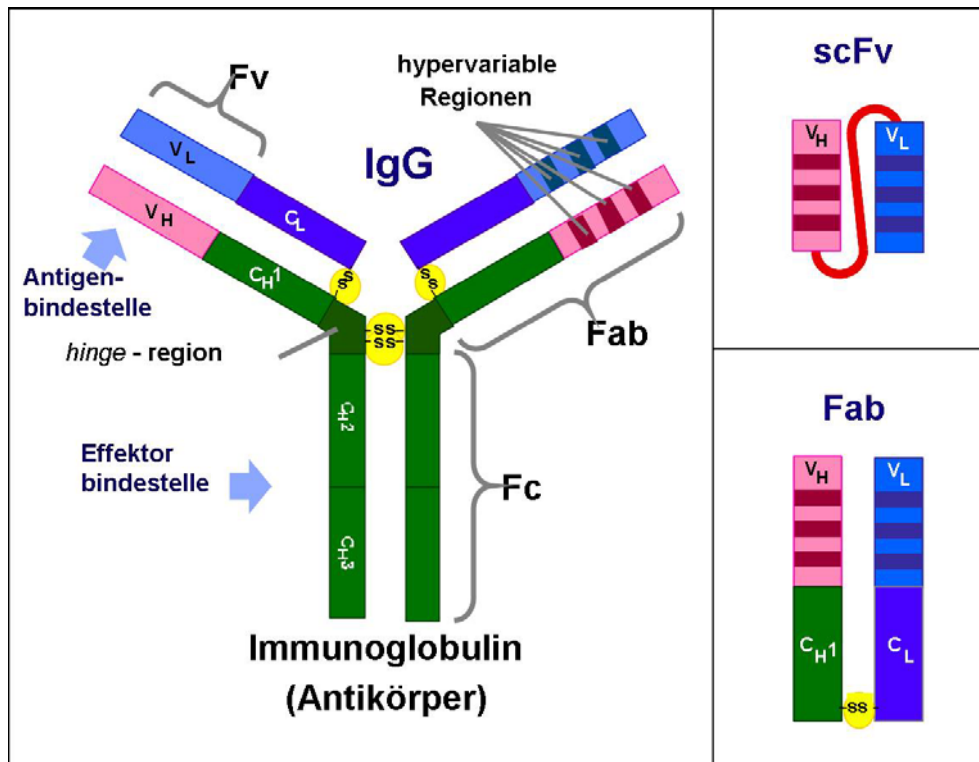


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines Immunglobulin G, eines scFv- und eines Fab-Antikörperfragmentes. Der auf der linken Seite abgebildete IgG weist die kovalente Bindung über intermolekulare Disulfidbrücken (gelb) zwischen den schweren und leichten Ketten, und innerhalb der hinge-Region (dunkelgrün) auf. Sichtbar ist die klare Trennung der Antigenbindestelle, mit V_H (hellblau) und V_L (rosa), und die Effektorbindestellen, mit hinge, C_{H2} und C_{H3} (grün). Die Zusammenfassung mehrerer Domänen resultiert in Fv (Fragment variable), Fab (Fragment antigen binding) und Fc (Fragment crystallizable). Auf der rechten Seite sind die kleineren Antikörperfragmente scFv (single chain Fv) und Fab dargestellt, deren ausgebildete Antigenbindestelle beim scFv über einen Peptidlinker (rot) und beim Fab über eine Disulfidbrücke stabilisiert wird.

In Diagnostik und Therapie sind rekombinante Antikörper von großer Bedeutung. Derzeit stehen die Generierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten, die Steigerung ihres Wirkungsgrades bzw. die Verbesserung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften sowie die Kopplung von Molekülen zur Erweiterung des Funktionsspektrums im Mittelpunkt der Forschung (Kap. 1.3). Der „single domain“ Antikörper (V_{HH}) aus Lamas, Haien etc. ist mit ca. 12kDa die kleinste antigenbindende Einheit (Hamers-Casterman *et al.* 1993). Zu den gebräuchlichsten Antikörperfragmenten zählen single chain Fv-Fragmente (scFv) und Fab-Fragmente (Abb. 1.1). Ein scFv setzt sich aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette zusammen, die über einen Peptidlinker miteinander fusioniert sind (Bird *et al.* 1988). Es existieren zahlreiche andere Antikörperformate und

Antikörperkopplungen, die über Eigenschaften wie Multivalenz, multiple Spezifität usw. verfügen.

Die Generierung von rekombinanten Antikörpern ist durch ein weites Spektrum an Technologien möglich. Es stehen zahlreiche Antikörper-Display-Verfahren (Phagen-, Hefe-, mRNA-, DNA-, Ribosomendisplay usw.) sowie transgene Tiere für die Selektion humaner Antikörper zur Verfügung. Die gebräuchlichsten Expressionssysteme zur Produktion rekombinanter Antikörper sind Säugerzelllinien für IgG und *E.coli* für Antikörperfragmente. Nach der erstmaligen Erzeugung humaner Antikörper mit einer zu humanen Glykosylierungsmustern identischen N-Glykosylierung ist *Pichia pastoris* insbesondere für therapeutische Antikörper ein weiteres zukunftssträchtiges Expressionssystem (Li *et al.* 2006). Es zeichnet sich im Vergleich zu Säugerzellexpressionssystemen vor allem durch geringere Produktionskosten (vereinfachte Fermentation und kostengünstigere Medienkomponenten) aus.

1.2 Generierung monoklonaler Antikörper

Wesentlicher Meilenstein in der Antikörper-Forschung war zunächst die Generierung monoklonaler Antikörper (mAk) durch die Hybridomtechnologie (Köhler und Milstein 1975). Zwecks Immortalisierung der antikörpersekretierenden B-Lymphozyten werden diese, nach ihrer Isolierung aus immunisierten Tieren zumeist Mäusen, mit Myelomzellen fusioniert. Aus den so entstandenen Hybridomzellen werden anschließend Klone identifiziert, deren sekretierte Antikörper spezifisch mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen reagieren. Der erste therapeutische Antikörper, der basierend auf dieser Technologie erzeugt wurde, war Orthoclone (OKT3), der die Abstoßung eines transplantierten Organs durch Immunsuppression von T-Lymphozyten verhindern sollte (Smith 1996). Als nachteilig erweisen sich Immunreaktionen gegen Antikörper murinen Ursprungs, wodurch deren therapeutische Wirkung neutralisiert werden kann. Humane anti-Maus Antikörper (HAMA) richten sich entweder gegen den konstanten Teil des heterologen Antikörpers, oder sie sind antiidiotypische Antikörper, d.h. sie richten sich gegen die variable Region des murinen Antikörpers. Um derartige Immunreaktionen zu umgehen oder zumindest zu reduzieren, wurden chimäre Antikörper und später humanisierte bzw. humane Antikörper erzeugt. Die Chimärisierung von Antikörpern betrifft nur die konstanten Domänen C_L, C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}, diese werden gegen humane Domänen ausgetauscht. Trotzdem kommt es bei der therapeutischen Verwendung von chimären Antikörpern zu einer humanen anti-chimären Antikörper Bildung (HACA), wenn auch mit reduzierter Häufigkeit. Die Humanisierung von Antikörpern geht noch einen Schritt weiter in Richtung humaner Antikörper. Bei der als „CDR-grafting“ bezeichneten Methode bleiben lediglich die spezifitätsbestimmenden

hypervariablen Bereiche (CDRs) des Antikörpers heterologen Ursprungs erhalten und werden in den Kontext eines humanen Framework eingefügt (Jones *et al.* 1992).

Die Erfahrungen mit murinen und chimären Antikörpern in der Therapie bzw. deren Immunogenität verstärkte die Bemühung komplett humane Antikörper zu erzeugen. Dabei ist der Weg über humane Hybridomzelllinien aus ethischen Gründen problematisch, da u.U. die Immunisierung eines menschlichen Individuums notwendig wäre. Vereinzelt wurden allerdings auf diesen Weg bereits humane Antikörper generiert (Carson und Freimark 1986). Dies führte zur Entwicklung alternativer Technologien, die die Generierung von humanen Antikörpern ermöglichen:

- 1) Antikörper-Display Verfahren
- 2) Transgene Tiere mit humanem IgG Repertoire

1.2.1 Antikörper-Display-Verfahren

Mittlerweile existieren verschiedene Antikörper-Display-Verfahren, wie Phagen-, mRNA-Ribosomen-, DNA-, Hefe- oder Bakteriendisplay, wobei das Phagendisplay, die am weitesten verbreitete Form ist. Im Prinzip spiegelt die Selektion spezifischer Antikörper über Display-Verfahren die *in vivo* Selektionierung des Immunsystems wieder. Der Prozess erfolgt jedoch *in vitro*. Die Generierung einer rekombinanten Antikörper-Gen-Bibliothek und ihre Diversität, sowie die Kopplung von Phänotyp und Genotyp, sprich der Kopplung des exprimierten Antikörpers und dessen genetischer Information, ist dem natürlichen *in vivo* Antikörperrepertoire vergleichbar. Über einen mehrfach wiederholten Selektionsprozeß (Panning) werden die für ein Antigen spezifischen Antikörper mitsamt der genetischen Information angereichert bzw. isoliert. Ein Vorteil dieser Technologie im Vergleich zu transgenen Tieren liegt in der Schnelligkeit, der robusten Handhabung sowie der Fähigkeit zur Generierung von Antikörpern gegen lethale Toxine, hoch pathogene Antigene und Antigene geringer Immunogenität. Dies ist bei der Verwendung transgener Tiere nur sehr sehr bedingt möglich (Hoogenboom 2005).

1.2.2 Transgene Tiere

Die Idee, transgene Tiere mit humanem Antikörper-Genrepertoire zur Schaffung humaner mAbs zu verwenden, wurde bereits vor über 20 Jahren propagiert (Alt *et al.* 1985). Allerdings erst 1994, als Methoden zur gezielten Einführung von Modifikationen ins murine Genom zur Verfügung standen, gelang es transgene Mäuse herzustellen, deren murine Genloci für schwere und leichte (κ) Kette unterbrochen waren und welche humane Transgene für die schweren (μ und γ_1 bzw. μ und δ) und leichten (κ) Ketten enthalten (Green *et al.* 1994 und

Lonberg *et al.* 1994). Bestehende Gentransfertechnologien wie „pronuclear microinjection“ in embryonale Stammzellen (ES) bzw. deren Fusion mit Hefeprotoplasten zum Transfer von YACs (*yeast artificial chromosomes*) zwecks homologer Rekombination limitierten den Transfer auf unvollständige Immunglobulin Genloci. Erst die sog. „Microcell mediated chromosome transfer“-Technologie befähigte zur Einführung von Chromosomen bzw. Chromosomfragmenten in murine ES Zellen. Mittlerweile wurden transgene Mäuse geschaffen, die über den kompletten humanen Genlocus der schweren Kette (IgH) und den vollständigen Igk Genlocus verfügen, ohne endogene (murine) Immunglobuline mit κ -leichten Ketten zu erzeugen (Kirin TC mouse). Dazu wurde ein knock-out der murinen Immunglobulingene (Δ IgH und Δ Igk) erzeugt. Separat wurden transchromosomale Mäuse durch Einführung artifizieller humaner Chromosomen mit kompletten IgH und Igk Genloci (huChr.22 und huChr.2) mittels Chromosomentransfer-Technologie in Mausembryos generiert. Entsprechendes Kreuzen der Knock-out Mäuse und der transchromosomalen Mäuse resultiert in der oben exemplarisch beschriebenen Kirin TC Maus (Tomizuka *et al.* 2000).

Wesentliche Vorteile dieser Technologie liegen in der geringen Immunogenität der Antikörper, der *in vivo* Affinitätsreifung bis zu subnanomolaren Affinitäten von Antikörpern und weiterer Selektion im Hinblick auf Stabilität und Aggregation. Gegenwärtig befinden sich über 30 humane mAks, die über transgene Mäuse generiert wurden, in klinischen Studien. Weiteres Potential ergibt sich aus der Entwicklung polyklonaler Antikörper für den Einsatz bei Infektionskrankheiten, die durch verschiedene Stämme humanpathogener Erreger verursacht werden, und bei der Neutralisation von Toxinen, die aus mehreren Komponenten bestehen (Lonberg 2005). Nachteilig ist die arbeitsintensive und zeitaufwendige Generierung von Hybridomen und deren Screening zur Isolierung des Klons, der den antigenspezifischen Antikörper produziert.

1.3 Antikörperbasierte Krebstherapien

Seit der Zulassung von Rituximab (Rituxan; Biogen Idec/Genentech) im Jahr 1997 als ersten krebstherapeutischen Antikörper durch die US Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (NHL), hat sich die Behandlung von Krebs mittels therapeutischen Antikörpern rasant weiterentwickelt (Übersicht: Tab. 1.1). Augenblicklich sind 5 monoklonale Antikörper für die Krebstherapie von soliden und hämatologischen Tumoren zugelassen (FDA, Stand Juni 2006). Weitere 5 mAks befinden sich in der letzten Phase klinischer Tests.

Therapeutikum	Ursprung	Isotyp/Konjugat	Antigen	Indikation	Zulassung/ klin. Phase
<u>Nicht konjugierte mAKs</u>					
Rituximab (MabThera/Rituxan)	chimär	Humaner IgG ₁	CD20	NHL	1997
Trastuzumab (Herceptin)	humanisiert	Humaner IgG ₁	HER2/neu	Metastasierende Mammakarzinome	1998
Alemtuzumab (Campath)	humanisiert	Humaner IgG ₁	CD52	Chronische lymphatische Leukämie, CLL	2001
Bevacizumab (Avastin)	Humanisiert	Humaner IgG ₁	VEGF	Metastasierende kolorektale Karzinome	2004
Cetuximab (Erbix)	Chimär	Humaner IgG ₁	EGFR	Metastasierende kolorektale Karzinome	2004
Ch 14.18	Chimär	Humaner IgG ₁	GD2	Neuroblastoma	Phase III
Rencarex (cG250)	Chimär	Humaner IgG ₁	G250	Nicht metastasierende Nierenkarzinome	Phase III
MDX-010	Human	Humaner IgG ₁ (kappa)	CTLA-4	Melanome	Phase III
Panitumumab (ABX-EGF)	Human	Humaner IgG ₂ (kappa)	EGFR	Bronchialkarzinome	Phase III
Apolizumab (Remitogen)	Humanisiert	Humaner IgG ₁	MHCII	NHL	Phase III
<u>Immunokonjugate</u>					
Gemtuzumab (Myelotarg)	Human	Humaner IgG ₄ /Calicheamicin	CD33	Akute myeloide Leukämie	2000
Ibritumomab (Zevalin) + Retuximab	Murin	Muriner IgG ₁ / Yttrium ⁹⁰	CD20	NHL	2002
Tositumomab Tositumomab- ¹³¹ I (Bexxar)	Murin	Muriner IgG _{2a} / Jod ¹³¹	CD20	NHL	2003
¹³¹ I-chTNT-1/B (Cotara)	chimär	Humaner IgG ₁ Jod ¹³¹	DNA DNA/Histon- Komplexe	Lungenkrebs	2003

Tab. 1.1: Übersicht der für die Krebstherapie zugelassenen und in der Forschung befindlichen Antikörper und Antikörperkonjugate. Bei den in der Forschung befindlichen Antikörpern handelt es sich nur um diejenigen, die kurz vor der Zulassung stehen, während sich bei den Antikörperkonjugaten viele noch in den frühen Phasen I und II der klinischen Testung befinden und daher nicht aufgelistet sind. (Quelle: Schrama et al. 2005, www.fda.gov, www.clinicaltrials.gov)

Die Wirkungsmechanismen der Antikörper (Abb. 1.2) beruhen dabei z.B. auf der Induktion einer Immunantwort, der Störung der Angiogenese oder der Blockade von Wachstumsfaktorrezeptoren auf Krebszellen (Adams, G.P. und Weiner, L.M. 2005).

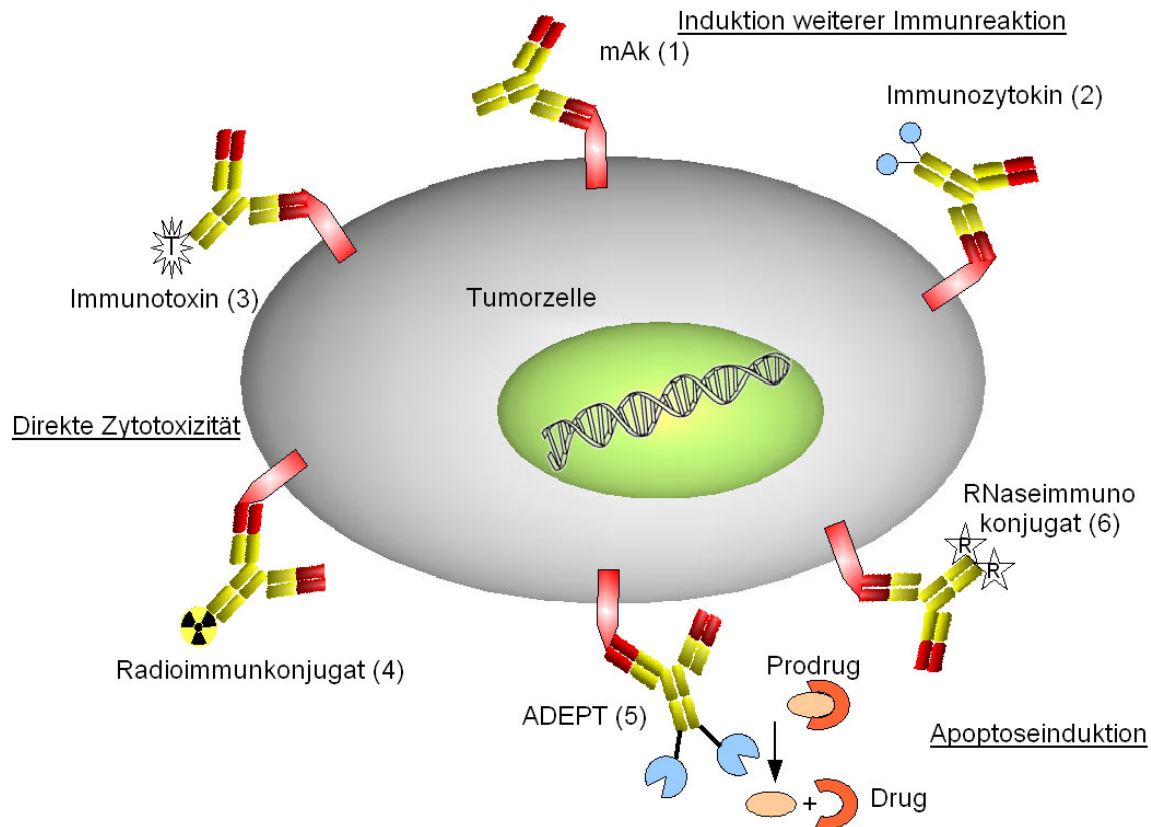


Abb. 1.2: Wirkungsmechanismen von Antikörpern in der Krebstherapie. Antikörper werden eingesetzt, um sie gezielt an tumorassoziierte Oberflächenmoleküle zu binden und unterschiedliche Wirkungsmechanismen hervorzurufen: Induktion weiterer Immunreaktionen (ADCC/CDC) durch (1) monoklonale Antikörper und (2) Antikörper-Zytokinkonjugate (z.B. IL-2). Direkte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzelle durch (3) Antikörpertoxin-Konjugate (Toxine pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs sowie Zytotoxine aus der Chemotherapie, z.B. Doxorubicin) oder (4) Radioimmunkonjugate. (5) Antikörper-Prodrug Aktivierung (ADEPT; *antibody directed enzyme prodrug therapy*). Induktion des programmierten Zelltods ausgelöst durch (6) Antikörper-RNase Konjugate (RNaseimmunkonjugat bzw. *Targeted RNase*).

1.3.1 Unkonjugierte monoklonale Antikörper

Zu den zytotoxischen Wirkungsmechanismen, die als Immunantwort von monoklonalen Antikörpern gegen Tumorzellen ausgelöst werden, zählen: Komplementaktivierung (CDC; „complement-dependent cytotoxicity“), antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) durch Phagozyten, wie Makrophagen, Neutrophile, u.a.. Als weiteres Wirkprinzip kann eine Modulation der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren erfolgen.

1.3.1.1 ADCC / ADCP

Die Bindung des Fc-Teils von Antikörpern der IgG Klasse an Fc-Rzeptoren bewirkt ADCC oder ADCP Reaktionen. Die Gruppe von Fc gamma-Rezeptoren (FcγR) setzt sich im

Menschen aus den Rezeptoren FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) (einschließlich der Isoformen FcγRIIa, FcγRIIb und FcγRIIc), und FcγRIII (CD16) (FcγRIIIa und FcγRIIIb) zusammen (Raghavan und Bjorkman 1996). Diese Fcγ-Rezeptoren werden auf verschiedenen Immunzellen sog. akzessorischen Effektorzellen, die die adaptive Immunantwort unterstützen, exprimiert. Sie sind mit Ausbildung von FcγR/Fc Komplexen neben zytotoxischen und phagozytotischen Vorgängen auch für die Aktivierung von B-Zellen und die Freisetzung von Granula verantwortlich.

Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wird von NK-Zellen über FcγRIIIa nach Antigenbindung auf den Tumorzellen vermittelt. FcγRIII erkennt nur Fc-Domänen der Subklassen IgG₁ und IgG₃. NK-Zellen setzen daraufhin zytoplasmatische Granula, welche Perforine und Granzyme enthalten, frei, was zum Tod der Tumorzelle führt.

Für die klinische Relevanz von FcγR/Fc induzierten Effektorfunktionen in der Krebstherapie mit monoklonalen Antikörpern gibt es keinen direkten Beweis. Zahlreiche *in vitro* Studien zu ADCC und Tests mit humanen Tumoren in Xenograft Knock-out Mäusen mit deletierten FcγRII/III deuten auf die Antitumoreigenschaft dieses Wirkungsmechanismus hin (Clynes *et al.* 2000). Einen weiteren Hinweis auf den Beitrag von ADCC in der Krebstherapie liefern Studien zu Rituximab. Innerhalb der Studie war die Behandlung mit Rituximab bei Patienten mit bestimmten Polymorphismen innerhalb des FcγRIIIa an einer Position, die direkt an der Bindung von Fc-Domänen beteiligt ist, wirksamer (Cartron *et al.* 2002).

1.3.1.2 CDC

Das Komplementsystem ist Bestandteil der angeborenen Immunität. Als klassischer Weg der Komplementaktivierung versteht man die Verknüpfung der adaptiven humoralen Immunantwort mit dem Komplementsystem. Nach der Antigen-Antikörper-Komplexbildung auf der Zelloberfläche des Tumors, werden C1q Bindungsstellen nahe der C_H2 Domäne zugänglich. Die geringe Affinität von C1q zu ungebundenen IgG erhöht sich durch Aviditätseffekte (C1q bindet an mehrere Antigen-Antikörper Komplexe) und setzt die Komplementkaskade in Gang. Im Verlauf der Komplementkaskade werden die beteiligten Plasmaproteine durch proteolytische Spaltung aktiviert, wobei diese aktivierten Komplementenzyme wiederum nachfolgende Komplementproteine spalten und aktivieren (triggered-enzyme Kaskade). Letztendlich entstehen in der Zellmembran der Tumorzellen Poren mit ca. 10 nm Durchmesser, die ein schnelles Eindringen von Wasser und Salzen in die Zelle erlaubt, die dadurch stirbt (Janeway *et al.* 2002).

Die Bedeutung von CDC als Wirkmechanismus konnte zumindest bei der Behandlung von CD20⁺ Lymphomen mit Rituximab aufgezeigt werden (Cartron *et al.* 2002). *In vivo* Versuche bei immunokompetenten C1q knock-out Mäusen mit murinen Lymphomen, welche stabil mit

humanen CD20 transfiziert wurden, zeigten im Gegensatz zur Kontrollgruppe (C1q⁺) eine erfolgreiche Behandlung mit Rituximab (chimär) bzw. murinem anti-CD20 mAk (Di Gaetano *et al.* 2003). Zusätzlich belegten *in vitro* Studien mit frisch isolierten Lymphomzellen von Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie (B-CLL) eine Korrelation des Expressionslevels an CD20 zu der durch Rituximab und CDC ausgelösten Lyse der Zellen (Golay *et al.* 2001).

1.3.1.3 Modulation von Signaltransduktionswegen

Ein weiterer Wirkmechanismus, der durch die Antikörpertherapie induziert werden kann, ist die Änderung von Signaltransduktionswegen. Primäre Ziele sind dabei insbesondere tumorassoziierte Rezeptoren von Wachstumsfaktoren bzw. deren Liganden. Von den bisher zugelassenen Antikörpern zielt Bevacizumab auf den Liganden (VEGF) des VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) und Trastuzumab, bzw. Cetuximab auf den EGFR (epidermal growth factor receptor) ab (www.fda.gov). Normalerweise führt die Aktivierung der Rezeptoren je nach Zustand der Zelle über verschiedene Signalkaskaden zur Stimulation des Zellwachstums und Hemmung des programmierten Zelltods (Apoptose). Die Überexpression derartiger Wachstumsrezeptoren auf Tumorzellen trägt zu einem unkontrollierten Wachstum bei, so dass in der Krebstherapie eine Unterdrückung bzw. Vermeidung solcher wachstumsunterstützender Signale angestrebt wird.

Die antikörpervermittelte Inhibition dieser Signalwege kann durch Blockade der Zusammenlagerung von Rezeptoren oder durch Verhindern des Andockens rezeptorspezifischer Liganden hervorgerufen werden. Alternativ ist auch die Vermeidung von Signaltransduktion mittels wachstumsfaktorspezifischer Antikörper möglich, indem der Antikörper-Ligandkomplex nicht mehr an die Rezeptoren anzudocken vermag.

Trastuzumab richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu (c-erbB-2), einem Mitglied der EGFR-Familie, zu der auch EGFR (c-erbB-1), HER3 (c-erbB-3) und HER4 (c-erbB-4) gehören. ErbB2 wird bei rund einem Drittel aller Mammakarzinome (Brustkrebs) und anderen Adenokarzinomen (Prostata, Lunge, Eierstock u.a.) überexprimiert (Cobleigh *et al.* 1999). Homo- und Heterodimerisierung innerhalb dieser Rezeptorfamilie führen zur Stimulation der Zellproliferation und Hemmung der Apoptose. Trastuzumab verhindert diese Dimerisierung durch die Bindung an HER2/neu. Eine direkte Folge ist die signifikante Reduktion von EGFR-Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen (Arteaga 2002).

Die nächste Generation von zugelassenen Antikörpern für die Krebstherapie wird zusätzliche Verbesserungen im Hinblick auf Effektivität und Effizienz der Wirkstoffe mit sich bringen. Schwerpunktmäßig sind dazu auf den Gebieten modifizierter Glykosylierungsmuster und

gezielter Aminosäureaustausch zur Verstärkung der ADCC sowie Variation der Antikörperformate und Antigenbindungseigenschaften für eine verbesserte Penetration solider Tumore Erfolge zu erwarten.

1.3.2 Antikörperkonjugate

Um die therapeutische Wirkung zu erweitern und zu verbessern, wurden Antikörperkonjugate entwickelt. Konjugiert werden die Antikörper i.d.R. mit Radioisotopen, Zytostatika, Enzymen, Toxinen, oder Zytokinen. In den nachfolgenden Kapiteln wird nicht auf bispezifische Antikörper und Immunozytokinkonjugate in der Krebstherapie eingegangen. Sie seien nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

1.3.2.1 Radioimmunotherapie

Für diese Therapieform sind bislang zwei Radioisotop-gekoppelte murine Antikörper von der FDA zugelassen: Tositumomab-Iod¹³¹ (Bexxar, GlaxoSmithKline) und Ibritumomab-Yttrium⁹⁰ (Zevalin, Schering), die beide bei der Behandlung von CD20 positiven Non-Hodgkin Lymphomen (NHLs) eingesetzt werden. Ein weiterer von der chinesischen FDA (SFDA) zugelassener Iod¹³¹ gekoppelter chimärer Antikörper (Cotara/131I-chTNT-1/B) wird bei der Behandlung von refraktärem Lungenkrebs eingesetzt (Chen *et al.* 2005).

Das Prinzip dieser Therapie basiert auf der zytotoxischen Strahlung radioaktiver Isotope, die mittels selektiver Bindung am Tumor durch die gekoppelten Antikörper lokal konzentriert wird. Eingesetzt werden vor allem Isotope, die hochenergetische β -Strahlung emittieren. Weitere Gesichtspunkte, nach denen therapeutisch relevante Isotope ausgewählt werden, sind deren Halbwertszeit, Zerfallsprodukte und Strahlungsreichweite. In der Entwicklung befinden sich jedoch vor allem α -Strahler (Bismuth²¹² bzw. Bismuth²¹³, Radium²²³), da sie durch ihre kürzere Reichweite leichter zu handhaben sind und über eine energiereichere ionisierende Strahlung verfügen (Kneba *et al.* 2001).

Cancerogene Effekte dieser Therapieform durch die emittierte Strahlung können zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Als wesentlicher Vorteil der Radioimmunotherapie ist hervorzuheben, dass für die zytotoxische Wirkung keine Internalisierung des Therapeutikums in die Zelle notwendig ist. Des Weiteren wirkt sich die der Strahlung zugrunde liegende Zytotoxizität nicht nur auf Tumorantigen überexprimierende Krebszellen aus, sondern auch auf Nachbarzellen der Tumorzellen (Bystandereffekt), bzw. bei heterogener Expression des Tumorantigens auf Zellen, die eine geringere oder keine Expression des Antigens aufweisen und deshalb kein oder nur geringfügig Radioimmunokonjugat direkt binden (Boyd *et al.* 2006).

1.3.2.2 Antikörpertoxine

Bei Antikörpertoxinen (Immuntoxine, IT) handelt es sich um Immunkonjugate, bei denen Antikörper oder Antikörperfragmente mit zytotoxischen Enzymen gekoppelt sind. Die Verbindung zwischen den beiden Einheiten erfolgt entweder durch einen chemischen Linker oder rekombinant über einen Peptidlinker. Die Toxine sind bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs, wie z.B. Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas*, Diphtheriatoxin (DT), Ricin, Arbin oder Saporin (Kneba *et al.* 2001). Oftmals ist ein einziges Molekül pro Zelle ausreichend, um einen zytotoxischen Effekt auszulösen (Eiklid *et al.* 1980). Eine selektive Wirkung der Toxine soll durch die Kopplung mit Antikörpern erreicht werden. Nach der rezeptorvermittelten Endozytose und retrogradem Transport des Konjugates findet die Translokation ins Zytoplasma in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Toxins über Endosomen (DT) oder das endoplasmatische Retikulum (ETA, Ricin) statt. Die bakteriellen Toxine DT und ETA katalysieren ADP-Ribosylierung an einer modifizierten Histidinseitenkette des Elongationsfaktors-2 (EF-2), wodurch die Proteinsynthese blockiert wird (Pappenheimer 1977 und Van Ness 1980). Bei den pflanzlichen Toxinen Ricin, Arbin und Saporin handelt es sich um Ribosomen-inhibierende Proteine, sog. RIPs, mit spezifischer Adenosinnukleosidase-Aktivität gegen 28s-rRNA, was ebenfalls zur Folge hat, dass die Proteinsynthese inhibiert wird, indem EF-2 nicht länger an die Ribosomen binden kann (Kneba *et al.* 2001). Die Herstellung derartiger Antikörperkonjugate als Fusionsproteine erweist sich jedoch als schwierig. Vielfach ist die Rückfaltung über Inclusionbodies aus *E.coli* der einzig realisierbare Weg funktionalen Wirkstoff zu erhalten (2. Fabisch Symposium, Targeted Tumor Therapies, Berlin 2006).

In zahlreichen klinischen Studien mit IT zur Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren konnten die überaus positiven präklinischen Ergebnisse bzgl. des therapeutischen Erfolges nicht bestätigen werden (Engert *et al.* 1997, Falini *et al.* 1992, Theuer *et al.* 1993). Bisher befindet sich kein IT weiter als in der Phase I der klinischen Forschung.

Als problematisch erwies sich in den durchgeführten klinischen Studien eine sich oftmals nach Applikation der IT ausbildende Immunantwort bei den Probanden, die auf der hohen Immunogenität der Toxine nicht-humanen Ursprungs beruht, bzw. im Fall von murinen Antikörpern als Bestandteil der IT u.U. auch zur Neutralisation der ITs durch HAMA Bildung führen kann (Kneba *et al.* 2001). Die Nutzung von humanen Antikörpern würde die Entstehung von HAMA als Immunreaktion umgehen. Eine weitaus geringere Immunogenität ist daher von humanen zytotoxischen Enzymen, wie humanen RNasen zu erwarten. Zusätzliche Nebenwirkungen bei der Behandlung mit IT sind schwere Leberschäden durch unspezifische Aufnahme der IT und das sog. „*vascular leak syndrome*“. Dabei dringt der Wirkstoff von der Blutbahn in umliegendes Gewebe ein und verursacht lokale Schädigung der Zellen.

1.3.2.3 **“Antibody directed enzyme prodrug therapy” (ADEPT)**

Der Begriff ADEPT („Antibody directed enzyme prodrug therapy“) definiert die spezifische enzymatische Umsetzung einer nicht-toxischen Vorstufe (Prodrug) zu zytotoxischen Molekülen durch Antikörper-Enzym-Konjugate am Ort des Tumors (Bagshawe 1987). Nach der Bindung des Konjugates an die Zelloberfläche von Tumorzellen muss der verbliebene ungebundene Anteil von Konjugaten aus der Blutzirkulation entfernt werden, damit die enzymatische Umsetzung der Prodrug nicht systemisch, sondern lediglich an der Oberfläche der Tumorzelle stattfindet. Der Abbau ungebundener Konjugate kann beispielsweise über Mannose-Rezeptoren der Leber initiiert werden, sofern die Antikörper-Enzymmoleküle über posttranslationale Mannosylierung verfügen (Chester *et al.* 2004). Im Anschluß wird die nicht-toxische Prodrug verabreicht und lokal durch die am Tumor befindlichen Antikörper-Enzym Konjugate in toxisches Produkt umgesetzt. Die in diesem Konzept eingesetzten Enzyme lassen sich in drei Gruppen eingruppiieren: I) Enzyme, die nicht aus Säugetieren stammen und von denen keine homologen Enzyme bei Säugetieren existieren, II) Enzyme, die nicht aus Säugetieren stammen aber bei denen homologe Enzyme bei Säugetieren existieren, III) Enzyme, die aus Säugetieren stammen (Senter 2001). Enzyme der Klasse III haben zwar den Vorteil nur schwach immunogen zu sein, jedoch überwiegt der Nachteil einer wesentlich unspezifischeren Freisetzung der Zytotoxizität bei der Prodrug-Umsetzung durch endogene Enzymaktivität. Daher werden in der Mehrzahl vorklinischer Studien Enzyme der Klasse I verwendet, wie z.B. β -Lactamase, Penicillin-Amidase, Cytosin-Deaminase oder Carboxypeptidase G2. Dem Nachteil erhöhter Immunogenität kann durch Modifikation der entsprechenden immunogenen Epitope begegnet werden (Mayer *et al.* 2004).

Augenblicklich befindet sich ein Antikörper-Enzymkonjugat zur Behandlung von kolorektalen Karzinomen im fortgeschrittenen Stadium, sowie gegen CEA (carcinoembryonic antigen) exprimierende Tumoren in klinischen Studien der Phase I. Das Konjugat MFE23-CPG2 setzt sich aus einem humanisierten scFv, spezifisch für CEA, und Carboxypeptidase G2 zusammen (www.eddn.org). Bei der Prodrug handelt es sich um die Vorstufe eines bifunktionalen Alkylierungsagents (4-[(2-Chloroethyl)(2-mesyloxyethyl)amino]benzoyl-L-glutamat), das nach Aktivierung die Selbsterhaltung und Proliferation von Tumorzellen durch kovalente Verknüpfung der dsDNA inhibiert (Sharma *et al.* 2005).

Zusammenfassend liegen die wesentlichen Vorteile des ADEPT Konzepts in der lokal begrenzten Anwendung stark zytotoxischer Wirkstoffe, die z.T. ebenfalls auf sog. Bystander-Zellen, d.h. Zellen in unmittelbarer Nähe zu den Antigen exprimierenden Zellen, einwirken. Im Falle einer heterologen Expression des Tumorantigens auf den Zielzellen können somit auch Tumorzellen abgetötet werden, die kein Antigen aufweisen, sich aber in räumlicher Nähe zu antigenpositiven Zellen befinden. Zudem ist wie bei Radioimmunkonjugaten keine

Internalisierung des Antikörperkonjugates erforderlich und die enzymatische Aktivierung der nicht-toxischen Prodrugmoleküle führt im Vergleich zu Immuntoxinen und Immunzytostatika zu einer stetigen Erhöhung der Konzentration toxischer Moleküle am und im Tumor (Senter 2001).

1.3.2.4 Antikörper-RNase-Konjugate

Bereits in den 50er Jahren wurde erkannt, dass pankreatische Ribonuklease *in vitro* einen inhibierenden Effekt auf Krebszellen ausübt, sowie bei Krebs in Tiermodellen zu einer verlängerten Überlebensdauer führt (Roth 1963). Dass RNase-Aktivität zytotoxische Auswirkung haben kann, wurde beispielsweise bei bakteriellen Zytotoxinen wie Colicin aus *E.coli* oder Zytotoxinen aus Pilzen (z.B. α -Sarcin aus *Aspergillus giganteus*) gezeigt. Beide Toxine verfügen über RNase-Aktivität, die spezifisch für ribosomale RNA ist (Konisky 1982, Endo und Wool 1982). Für zahlreiche weitere RNasen wurden u.a. zytotoxische bzw. Antitumor Eigenschaften nachgewiesen. So verursachten bovine RNase (isoliert aus Sperma) und Onconase (isoliert aus *Rana pipens*) bei der Inkubation mit Tumorzellen eine deutliche Reduktion der Proteinsynthese (Wu *et al.* 1993, Deonarain *et al.* 1994). Die Aufnahme der RNase erfolgt über Dynamin-unabhängige Endozytose gefolgt von der Translokation ins Zytoplasma, die vermutlich wie bei Diphtheriatoxinen über die Endosomen erfolgt, jedoch mit der Ausnahme, dass die Translokation von RNasen keine Absenkung des pH Wertes in den Endosomen erfordert (Haigis und Raines 2002).

Um eine selektive Zytotoxizität von RNasen in der Krebstherapie zu erzielen, wurden, ähnlich wie bei Immuntoxinen, RNasen an Liganden oder Antikörper gekoppelt, die ein zellspezifisches „Targeting“ (*Targeted RNasen*; TR) von Tumorzellen erlauben.

Der molekulare Wirkmechanismus setzt sich im Wesentlichen aus drei Schritten zusammen: I) zellspezifische Bindung, II) Endozytose und Translokation ins Zytoplasma, III) enzymatische RNA-Degradation, die zum Zelltod führt (Abb. 1.3). Ob die Translokation ins Zytoplasma für *Targeted RNasen* nach erfolgter rezeptorvermittelter Endozytose identisch ist mit der Translokation von RNasen, ist nicht bekannt.

In früheren Versuchen wurde bovine pankreatische RNase mit Transferrin bzw. einem Transferrinrezeptor (CD71) spezifischen „*single chain*“ Antikörper chemisch gekoppelt. Diese Konjugate wiesen eine 10^4 -fach geringere inhibitorische Konzentration 50% (IC_{50}) auf als unkonjugierte RNase (Rybak *et al.* 1991). Neuere Ansätze gehen in Richtung humane Antikörper-RNase Konjugate und Fusionierung von RNase und Antikörper durch Peptidlinker anstelle chemischer Kopplung. Zusätzlich kommen vermehrt tumorrelevante Antikörper in vorklinischen Studien zum Einsatz.

Die zur bovinen pankreatischen RNase homologe humane pankreatische RNase wurde in TR-Fusionsmolekülen verwendet, deren scFv-Antikörper spezifisch CD71 (Zewe *et al.* 1997) bzw. ErbB2-positive Karzinome erkennen (De Lorenzo *et al.* 2004). Das von De Lorenzo beschriebene Fusionsprotein, war das erste vollständig humane Antikörper-RNase Konstrukt.

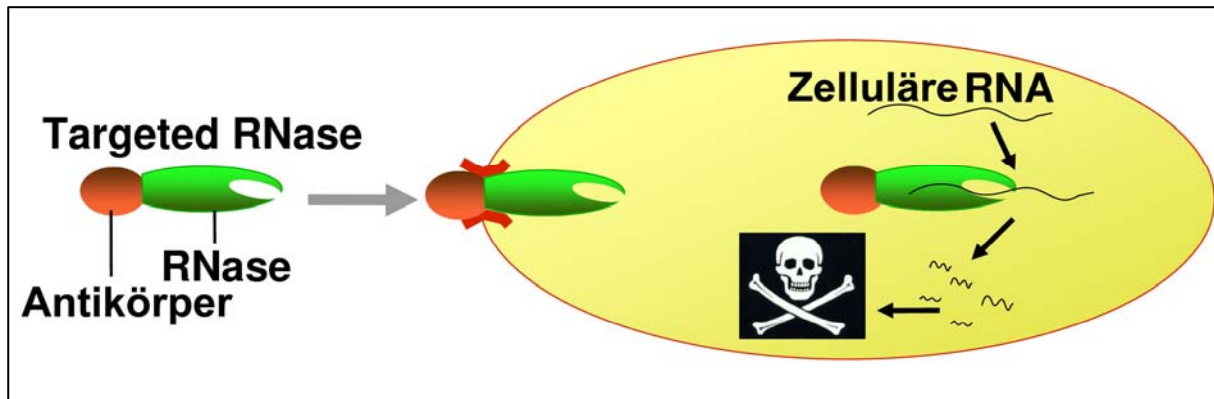


Abb. 1.3: Funktionsmechanismus der Targeted RNase. Das Antikörper-RNase-Konjugat bindet selektiv an entsprechende internalisierende Tumormarker. Nach erfolgter Internalisierung und Translokation ins Zytoplasma, wird zelluläre RNA durch die RNase degradiert, was den Zelltod für die Zelle bedeutet.

Wesentlicher Vorteil dieses therapeutischen Ansatzes im Vergleich zu Immuntoxinen liegt in der nicht vorhandenen Toxizität der RNase im extrazellulären Raum und im Fall humaner RNasen in ihrer geringeren Immunogenität. Diese Form der Therapie beschränkt sich allerdings auf internalisierende Tumorzellmarker.

1.4 CD30 als Tumormarker bei Lymphomen

CD30 wurde erstmalig 1982 als charakteristisches Oberflächenprotein von Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen bei Hodgkin-Lymphomen (HL) beschrieben (Schwab *et al.* 1982, Dürkop *et al.* 1992). Weitere Screenings auf CD30 Expression ergaben, dass zwei zusätzliche hochmaligne Lymphomarten (ALCL: anaplastic large cell lymphoma, ATL: adult T-cell lymphoma), die der Kategorie der Nicht-Hodgkin Lymphomen (NHL) zugeordnet werden, ebenfalls CD30 positiv sind.

1.4.1 Charakteristische Merkmale von CD30

Die chromosomale Lokalisation 1p36 wurde für die genetische Information von CD30 identifiziert. Es handelt sich bei CD30 um ein sog. Typ I Transmembranprotein, d.h. der N-Terminus reicht in den extrazellulären Raum und der C-terminale ins Zytoplasma (Abb. 1.4). Die molekulare Masse des stark glykosylierten Proteins beträgt 120kDa, die des Precursor

Proteins ca. 90kDa. Der überwiegende Anteil des Proteins ist mit 362 von 595 Aminosäuren im extrazellulären Raum lokalisiert. Im Unterschied zum murinen CD30 liegen die Cystein-reichen Domänen (CRDs) bei der homologen humanen Form als Duplikat vor, wobei die vierte CRD, ausgehend von N-Terminus, leicht verkürzt ist. Die CRDs umfassen jeweils ca. 40 Aminosäuren, mit je drei intramolekularen Disulfidbrücken, die von jeweils sechs hochkonservierten Cysteinen ausgebildet werden. Die zytoplasmatische Domäne verfügt über keine katalytische Funktion, was für Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie, zu denen CD30 zählt (TNFRSF8), ein typisches Merkmal ist.

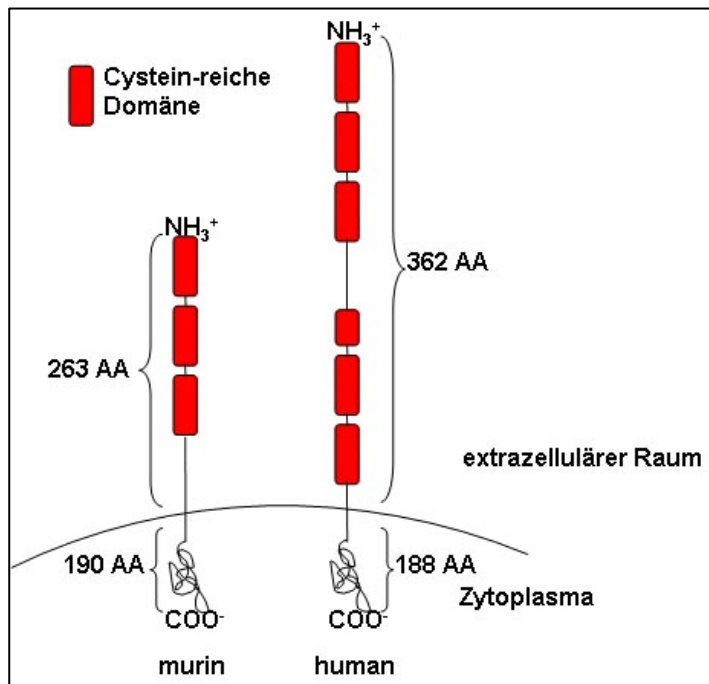


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau des murinen bzw. humanen CD30. Im Vergleich zum murinen Rezeptor liegt beim humanen CD30 eine Duplikation der Cystein-reichen Domänen vor.

Shedding der extrazellulären Domäne durch Zink-Metalloproteasen verursacht die lösliche Form von CD30 (soluble CD30; sCD30). Hohe sCD30 Level sind in Seren von Patienten mit Neoplasien, Autoimmunerkrankungen, wie der Systemischen Lupus Erythematos und der rheumatoiden Arthritis, aber auch bei Virusinfektionen (HIV-1, EBV, HTLV-1, Hepatitis B virus) detektierbar (Hansen *et al.* 2000). Der sCD30-Level korreliert bei Neoplasien dabei mit Krankheitsstadium, Tumormasse und negativer Prognose; bis zu 1500-fach über dem Normalwert. Der Serumlevel von sCD30 kann daher als prognostischer Faktor bei HL und ALCL dienen (Nadali *et al.* 1997).

Eine normale CD30-Expression findet nur auf hämatopoetischen Zellen, i.d.R. als Folge von Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten, statt. Einzige bisher bekannte Ausnahme sind endometriale, deciduale Zellen. Der natürliche Ligand von CD30 ist das Membranprotein CD30L bzw. CD153, das u.a. auf aktivierten Lymphozyten, aber auch Monocyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Bindung des CD30-Liganden leitet die für TNF-Rezeptoren charakteristische Trimerisierung des Rezeptors ein, dessen weitere Signaltransduktion biologische Effekte wie Proliferation und

Aktivierung bei HL Zellen oder auch konträre antiproliferative, zum Zelltod führende Effekte bei ALCL hervorruft (Banner *et al.* 1993). Die Signaltransduktion vermittelt vornehmlich die Aktivierung zweier Transkriptionsfaktoren NF- κ B und c-jun. Welcher Art der biologische Effekt ist, hervorgerufen durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion, hängt vom Zelltyp, weiteren Stimuli und dem Stadium der Differenzierung ab.

1.4.2 Hodgkin-Lymphome (HL)

Benannt wurde diese als Morbus Hodgkin bezeichnete Krebserkrankung nach dem englischen Arzt Thomas Hodgkin, der sie 1832 erstmalig beschrieb. Der Morbus Hodgkin gehört – zusammen mit der großen Gruppe der so genannten Non-Hodgkin-Lymphome – zu den malignen Lymphomen. Beim Hodgkin-Lymphom (HL) lassen sich in befallenen Lymphknoten und Organen unter dem Mikroskop sogenannte Reed-Sternberg-Zellen nachweisen, die bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) nicht vorkommen. Diese mehrkernigen Zellen entstehen durch Zusammenschluss mehrerer „Hodgkin-Zellen“, welche entartete B-Lymphozyten darstellen. Bei HL sind am häufigsten die Lymphknoten betroffen, aber auch andere Organe wie Lunge, Leber, Knochenmark und Milz können insbesondere in fortgeschrittenen Krankheitsstadien befallen sein. Bei HL handelt es sich um eine seltene Tumorerkrankung mit einer Häufigkeit von ca. 4 Fällen auf 100000 pro Jahr. Oftmals sind Personen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren bzw. im späteren Lebensabschnitt zwischen 60 und 70 Jahren von HL betroffen. Die Heilungsaussichten bei HL sind vergleichsweise gut, da die malignen Zellen äußerst sensitiv auf Strahlentherapie reagieren, so dass ca. 85% aller Patienten durch eine entsprechende Therapie geheilt werden können. Allerdings bei den Patienten, die einen Rückfall erleiden, liegt die Wahrscheinlichkeit für eine symptomfreie Remission nach der zweiten Behandlung bei unter 30%. (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Yung und Linch 2003))

Hodgkin-Lymphome entstammen aus malignen B-Lymphozyten, bei denen es innerhalb der Immunglobuline zu Genumordnungen gekommen ist. Diese B-Zellen entwickeln sich entweder nur bis zum post-Keimbahn-Stadium (unreife B-Zelle), oder sie exprimieren als reife B-Zelle keine Immunglobuline aufgrund somatischer Mutationen innerhalb der V-Regionen bzw. Fehlregulationen des Transkriptionsapparates (Janeway *et al.* 2002). Von den B-Zellrezeptoren gehen für das Überleben der Zelle notwendige Signale aus, so dass ein Fehlen dieser Rezeptoren für die B-Zellen einen Nachteil bei der Selektion bzw. das Überleben bedeutet, es sei denn antiapoptotische Effekte gleichen diesen Nachteil aus. Der genaue regulatorische Ablauf bzw. die Ursache der Lymphomgenese, die zum Überleben der Hodgkin/RS-Zellen führt, ist nicht bekannt. Eine mögliche Beteiligung onkogener Viren wird in Betracht gezogen, da 40% von HL-Patienten eine Infektion mit dem Epstein-Barr-

Virus (EBV) aufweisen, dessen Membranprotein LMP1 für seine onkogene Wirkung durch die Induktion der Expression des antiapoptotischen Gens *bcl2* bekannt ist (Knecht *et al.* 1993). Weitere lymphotrope Viren wie das humane Immunodefizienz-Virus (HIV-1) oder das humane T-Zell-lymotrope Virus Typ I (HTLV-1) können in die Pathogenese bei EBV negativen Fällen involviert sein, die oftmals mit einem immunsupprimierten Zustand der Patienten gekoppelt ist. Eine antiapoptotische Wirkung geht auch von der erwähnten Aktivierung von NF- κ B über die Signaltransduktion von CD30 aus (Yung und Linch 2003).

Bei Hodgkin-Lymphomen ist die Therapie abhängig vom Stadium der Erkrankung (Ann-Arbor Klassifikation) sowie weiteren Risikofaktoren, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen wird. Im Stadium I-II (Befall einer Lymphknotenregion oder von lymphatischem Gewebe mit bis zu 2 oder mehr Lymphknotenregionen, die auf einer Seite des Zwerchfells betroffen sind) wird mit 2 bis 4 Zyklen Chemotherapie und lokaler Radiotherapie behandelt. Als derzeitiger Standard der Chemotherapie gilt ABDV (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin). Im Stadium III-IV (Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen beidseitig des Zwerchfells bzw. Befall extralymphatischer Organe) wird als Chemotherapie entweder BEACOPP oder Stanford V in Verbindung mit Strahlentherapie eingesetzt. Bei beiden Chemotherapien handelt es sich um eine wesentlich intensivere Behandlung mit höheren Dosen als bei ABDV (Horning *et al.* 2002, Diehl *et al.* 2001).

Obwohl eine relativ hohe Heilungsrate von ~85% vorliegt und die Wahrscheinlichkeit einer 20jährigen Überlebensrate von ca. 90% mit der Überlebensrate einer altersgleichen Kontrollgruppe von 98,5% bei Patienten unter 30 Jahre vergleichbar ist, sterben in der BRD ca. 600 Menschen jährlich an HL. Wesentlich gravierender sind die Nebenwirkungen und Spätfolgen der Therapie, wobei die häufigste Todesursache in der Entstehung maligner Tumore, insbesondere Lungenkrebs, als Folge der Strahlentherapie zu sehen ist. Ebenso problematisch sind myeloide Tumore als Folge der angewandten alkylierenden Wirkstoffe überwiegend in Fällen mit wiederkehrender HL und dadurch bedingter extensiver Chemotherapie (Yung und Linch 2003). Bei jungen Frauen besteht zudem eine 20-50% Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Brustkrebs als Folge der Bestrahlung, wobei eine Korrelation zwischen der Höhe der Strahlendosis und der Entstehung von Mammakarzinomen existiert. Weitere Nebenwirkungen umfassen Neoplasien, wie NHL, Magen-, Darm-, Schilddrüsenkrebs und Hautkrebs. Zusätzlich bestehen Risiken eines Herzversagens vor allem bei mediastinaler Bestrahlung, einer Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) bei Bestrahlungen des unteren Nackenbereiches sowie der Unfruchtbarkeit als Folge von Strahlen- und Chemotherapie.

1.4.3 Non-Hodgkin Lymphome (NHL)

Die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) fasst eine Vielzahl maligner Lymphomerkrankungen zusammen, welche nach der histologischen Untersuchung des befallenen Gewebes nicht in die Kategorie der Hodgkin Lymphome fallen. Wie bei HL sind primär die Lymphknoten befallen, während in späteren Stadien weitere Organe (siehe Kap. 1.4.2) befallen werden. In der BRD erkranken jährlich ca. 15 von 100000 Menschen an NHL (Deutsche Krebsgesellschaft e.V.). Aufgrund ihrer Malignität, Ausbreitungsart und Wachstumsgeschwindigkeit werden NHL in niedrigmaligne und hochmaligne Lymphome unterteilt. Zu den hochmalignen Formen zählen auch das sog. großzellige anaplastische Lymphom und das adulte T-Zell-Lymphom (ATL), welche beide als charakteristisches Merkmal CD30 positiv sind und letzteres sich von malignen T-Zellen ableitet, während ALCL sowohl aus T- als auch B-Zellen hervorgehen kann (Nerl *et al.* 2004). In 90% der Fälle lassen sich NHLs auf maligne B-Lymphozyten und in 10% der Fälle auf maligne T-Lymphozyten zurückführen. T-NHLs stellen daher eine sehr seltene Krebserkrankung dar. Die Ursachen für die Lymphogenese bei ALCL ist, wie bei HL, nicht aufgeklärt. Als eine mögliche genetische Ursache bei ALCL wird die Überexprimierung einer potentiell onkogenen Tyrosinkinase (anaplastische Lymphom-Kinase; ALK) auf dem Chromosom 2 angeführt (Falini *et al.* 1999). In über 65% der Fälle zeigt sich eine Translokation des Gens t[2;5], die in einer Fusion des Tyrosin-Kinase Gens mit dem Nucleoplasmin-Gen resultiert. Als gesichert gilt die Ursache für die Lymphombildung bei ATL. Die Entstehung wird als Folge der Virusinfektion mit HTLV-1 angesehen, welches für die maligne Transformation der T-Zelle verantwortlich ist (Poiesz *et al.* 1980). Bei ALCL und ATL werden abhängig vom Stadium Chemo- und Strahlentherapien angewandt. Bei ALCL beträgt die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission für eine Dauer von 5 Jahren ca. 70-80%.

Alternative Behandlungsmethoden, die Nebenwirkungen und Folgen der Therapie (Kap. 1.4.2) von CD30⁺ Lymphomen abschwächen bzw. umgehen, sind daher erstrebenswert. Neue Wege, die beschritten werden, umfassen verträglichere Zytostatika wie Gemcitabine, aber auch immuntherapeutische Ansätze mit CD30-spezifischen Antikörpern, I¹³¹ markierten CD30 spezifischen Antikörpern, Immuntoxinen und bispezifischen Antikörpern, wie z.B. antiCD30-antiCD16 und antiCD30-antiCD64 (Borchmann *et al.* 2002, Borchmann *et al.* 2003, daCosta *et al.* 2000, Schnell *et al.* 2005).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Konzept der *Targeted RNasen* an einem therapeutisch relevanten Tumormarker validiert werden. Hierfür sollte ein bereits existierendes

rekombinantes humanes Antikörperfragment eingesetzt werden, das CD30-spezifisch ist. CD30 ist als Tumormarker in einer Reihe von Lymphomen von potentieller therapeutischer Bedeutung. Als RNase sollte die humane pankratische RNase (RNase1) verwendet werden, was die erstmalige Generierung eines vollständig humanen CD30 spezifischen Antikörper-RNase-Fusionskonstruktes bedeutet. Dazu sollte zunächst ein geeignetes Format für das Antikörper-RNase-Konjugat ermittelt werden, welches nach erfolgreicher Expression bzgl. seiner RNase-Aktivität, Zytotoxizität, Bindungseigenschaften, Internalisierung über rezeptorvermittelte Endozytose, ADCC und Inhibierung der Proliferation von CD30⁺ Tumorzelllinien charakterisiert werden sollte. Des Weiteren sollten neue Antikörperformate entwickelt werden, die u.a. auch im Kontext des *Targeted RNase* Ansatzes verwendbar sind. Hierbei galt es, insbesondere die Möglichkeit zur Produktion in den eukaryotischen Expressionssystemen *P. pastoris* und humanen Zelllinien zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pro- und eukaryotische Stämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen gearbeitet:

E.coli XL1blue:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'*proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]
(Stratagene, La Jolla, USA)

E.coli DH5α:

supE4 ΔU169 (80*lacZΔM15*) *hsdR17 recA endA1gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan D., 1983 und Bethesda 1986)

2.1.1.2 *Pichia pastoris*

KM71H Invitrogen, Karlsruhe

2.1.1.3 Mammalia-Zelllinien

Zellen	Kulturmedium	Bezugsquelle
293T	DMEM + 2 mM L-Glutamine +1.5 g/L Sodium Bicarbonate und 4.5 g/L Glucose + 10% Fötales Kälberserum (FCS)	ATCC No: CRL-11268
Jurkat E6.1	RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 8% FCS	ECACC No. 88042803
Karpas299	RPMI 1640 + 8% FCS	DSMZ: ACC31
HD-MY-Z	RPMI 1640 + 8% FCS	DSMZ: ACC346

2.1.2 Plasmide

pPICZαA	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV/myc/ER	Invitrogen, Karlsruhe
pIT2-aCD30(4E3)scFv	Kooperation mit Dr. Konthur (MPI, Berlin)
pSL1-215	Arbeitsgruppe Dübel, TU Braunschweig
pSH1-215	Arbeitsgruppe Dübel, TU Braunschweig
pHAL1-D1.3Fab	Arbeitsgruppe Dübel, TU Braunschweig

2.1.3 Oligonukleotide

scFv (Pichia):

aCD30 XhoI fwd	5'- ATATATCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAGGTGCAACTGT TGGAGTCTGG-3'
aCD30 XbaI rev	5'-TTTAAATCTAGACCTCCTGAGGATTTGATTTCCACCTTGGTCC-3'

scFv-RNase:

aCD30VH BssHII fwd	5'-ATATAAGCGCGCACTCCGAGGTGCAACTGTTGGAG-3'
aCD30 NotI I rev	5'-TATATACCTGAGGATGCGGCCGCCCGTTTGATTTCCAC-3'
RNase NotI fwd	5'-TTTAAAGCGGCCGCATCCTCAGGAAAGGAATCCAAGAAAT TCC-3'
RNase XbaI rev	5'- AAATTTTCTAGATTAAGCATCAAAGTGGACTGGCAC -3'

IgG:

aCD30VL BssHII fwd	5'-ATATAAGCGCGCACTCCGACATCCAGATGACCCAG-3'
aCD30VL HindIII rev	5'-ATTATAAAGCTTGGTCCCTTGGCCGAACG-3'
aCD30VH BssHII fwd	5'-ATATAAGCGCGCACTCCGAGGTGCAACTGTTGGAG-3'
aCD30VH NheI rev	5'-AAATTTGCTAGCGCTCGAGACGGTGACCAG-3'

scFv-RNase-Fc:

Fc BamHI fwd	5'-TATATAGGATCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC-3'
Fc Xba rev	5'- GCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGATAATCTAGATATATA-3'

scFv-Fc(-RNase):

Fc NotI fwd	5'-CTGCGGCGGCCGCTGAGCCCAAATCTTGTGAC-3'
Fc HindIII XbaI rev	5'- CAGAAGAGCCTAAGCTTGTCCCCGGGTAAATAAGGATCCTCTA GAAGCTC-3'
RNase HindIII fwd	5'-ATATATAAAGCTTGTCCCCGGGTAAAGCGGCCGCATCCTCAGG AAAGGAATCC-3'
RNase XbaI rev	5'-AAATTTTCTAGATTAAGCATCAAAGTGGACTGGCAC-3'

CD30-Fc:

CD30 BssHII fwd	5'-TTATAAGCGCGCACTCCTTCCCACAGGATCGAC-3'
CD30 NheI rev	5'-ATATATGCTAGCCTTCCCCGTGGAGGAGAGAGC-3'

scFab:

D1.3 XhoI fwd	5'-ATATATCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGACATCGAGCTCA CCCAGTCTCC-3'
---------------	-----------------------------------------------------------------

D1.3 ΔC XbaI rev	5'-AAATTTTCTAGATCGCGCGGTACGATTTTCTTG-3'
D1.3 XbaI rev	5'-ATATATTCTAGACAATCGCGCGGTACGATTTTC-3'
<u>sclgG:</u>	
CH2CH3 NheI fwd	5'-ATATATGCTAGCCGCTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CAC-3'
D13 BssHII fwd	5'-AATTAAGGCGCGCACTCCGACATCGAGCTCACCCAGTCTC-3'
Fc XbaI rev	5'-GCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGATAATCTAGATATATA-3'

weitere Sequenzierungsoligonukleotide:

BGH polyA rev	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
CD30 fwd I	5'-GGATGATTGTCAAGTTCC -3'
CD30 fwd II	5'-TGGACGAGGCCGCGCTG -3'
CD30 fwd III	5'-AACCAGCGCTCCCGTCG -3'
CD30 fwd IV	5'-TGCAGGATGCCAGCC -3'
CH2 rev	5'-GGTCCGGGAGATCATGAGGGTG-3'
CMV Promoter fwd	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
Pichia α-factor fwd	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'
Pichia AOX1_fwd	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
Pichia AOX1_rev	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
RNase fwd	5'-TGCATACCGGACCAGCCCGAAG-3'
RNase rev	5'-TTGGGGTACCTGGAGCCGTTTG-3'

2.1.4 Antikörper und Cytokine

Kaninchen-α-Maus IgG Antikörper-PE Konjugat	(Sigma, München)
Monoklonaler Maus-α-human IgG (Fc spezifisch) Antikörper	(Sigma, München)
Monoklonaler Maus-α-Kaninchen IgG (γ spezifisch)	(Sigma, München)
Antikörper-AP Konjugat	
Ziege-α-human IgG (Fc spezifisch) Antikörper-AP Konjugat	(Sigma, München)
Ziege-α-human IgG (Fc spezifisch) Antikörper-FITC Konjugat	(Sigma, München)
Ziege-α-human IgG (Fc spezifisch) Antikörper-HRP Konjugat	(Sigma, München)
Ziege-α-Maus IgG (Fab spezifisch) Antikörper-AP Konjugat	(Sigma, München)
Ziege-α-Maus IgG (Fc spezifisch) Antikörper-FITC Konjugat	(Sigma, München)
Ziege-α-Maus IgG (Fc spezifisch) Antikörper-HRP Konjugat	(Sigma, München)
Humanes IL-2	(Roche, Penzberg)

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Es wurden Chemikalien und Enzyme der folgenden Firmen benutzt: Fluka (Neu-Ulm), Riedel de Häen (Seelze), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt a.M.), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), und BioRad (München). Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang beschrieben.

2.1.6 Kit-Systeme

Gel Filtration LMW Calibration Kit	(Amersham, Uppsala, Sweden)
Genelute HP Plasmid Midiprep Kit	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
GFX PCR DNA, Gel Purification Kit	(Amersham, Uppsala, Sweden)
GFX micro Plasmid prep Kit	(Amersham, Uppsala, Sweden)
HEKfectin	(Bio-Rad, Hercules, CA)
LDH Cytotoxicity Detection Kit	(Roche Diagnostics, Penzberg)
Luciferase Reporter Assay Kit	(BD Biosciences, Palo Alto)
Rabbit Reticulocyte Lysate System	(Promega, Madison, USA)
RNasin	(Promega, Madison, USA)

2.1.7 Laborgeräte und Zubehör

Zentrifugen	Biofuge pico Zentrifuge 5415 D	Heraeus-Christ, Eppendorf
	Zentrifuge 5810R	Eppendorf
	Multifuge 3 S-R	Heraeus
	Sorvall RC 5 (SS34, GS-3 and SLA3000)	Sorvall
Elektroporationskammer	Gene Pulser II, Pulse Controller	BioRad, Hercules, CA, USA
UV/Visible Spectrophotometer	Libra S11	Biochrom, U.K.
	Ultrospec 3100 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia
Elektrophoreseapparatur	Electrophoresis power supply EPS 601/301	Amersham, Uppsala, Sweden
	Miniprotean 3 cell	BioRad, Hercules, CA, USA
	Semi-dry Transfer Cell	BioRad, Hercules, CA, USA
Proteinaufreinigung	Dialysesschläuche	Visking Servapor and Membracell
	Äkta prime	Amersham, Uppsala, Sweden
	1mL Protein A Säule	Amersham, Uppsala, Sweden
	1mL ProteinL	Pierce, Rockford, USA
	Superdex 200	Amersham, Uppsala, Sweden
Mixer	Thermomixer compact	Eppendorf
	Vortex genie 2	Scientific industries, Bohemia N.Y.
	Platform rocker Str6	Bibby start, UK
Filtrvorrichtungen	Millipore Ultrafiltration membranes	Amicon bioseparations, Molsheim, France
	Cellulose Acetate Filter: 0,2 µm, 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen
	Whatman Filterpapier	Whatman, England

	Arium 611	Sartorius AG, Göttingen
	Filtriereinheit	Nalge company
Cleanbench	Lamiar HLB 2472	Heraeus
Schüttler	Certomat BS-1	B.Braun Biotech international
Squenzierer	A&B Applied Biosystems, ABI prism 310 collection.	Perkin-Elmer, Applera
Durchflusszytometrie	Beckman Coulter FC500	Beckman Coulter, Fullerton, USA
PCR-Cycler	PTC200 Peltier Cycler	MJ Research
Freezer	4°C, -20°C and -80°C	Lieberherr, Hera Freeze
Mikroskop	Konfokales Laserscanning Mikroskop	Zeiss, Jena
Lumineszenz-, Fluoreszenz-, ELISA-Reader	Tecan GENios Tecan GENios Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim

2.1.8 Nährmedien und Zusätze

E. coli und *P.pastoris*:

Hefeextrakt	(BD, Sparks, USA)
Pepton	(BD, Sparks, USA)
Trypton	(BD, Sparks, USA)
YNB	(BD, Sparks, USA)

Zellkultur:

DMEM	(PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich)
Fötale Kälberserum (FCS)	(PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	(PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich)
RPMI 1640	(PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich)
Trypsin/EDTA	(PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich)

2.1.9 Sonstiges

DAPI	(Pierce, Rockford, USA,)
Ficoll-Paque	(Amersham GE, Freiburg)
Nunc F96 MicroWell Plates (weiß)	(Nunc, Wiesbaden)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von transformierten *E.coli* Stämmen erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen bei 37°C ü.N.. Für die Kultivierung in Flüssigmedium zur Plasmidgewinnung oder Herstellung von Glycerolkulturen wurde von einer Einzelkolonie ausgehend 5 mL Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz bei 37°C und 250 rpm ü.N. inkubiert. Zur Herstellung von Glycerolkulturen zwecks Lagerung wurde die Bakterien-suspension der ü.N.-Kultur mit sterilem Glycerol (20%Endkonzentration) vermischt, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung und Lagerung von *Pichia pastoris*

Die Kultivierung von *P.pastoris* ist mit Ausnahme der Nährmedien (YPD statt LB) und der Temperatur (30°C statt 37°C) analog zu *E.coli*. Gleiches gilt für die Lagerung bzw. Erstellung von Glycerolkulturen.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Es wurden chemischkompetente *E. coli*-Zellen zur Plasmidtransformation verwendet. Dazu wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL ü.N.-Kultur eines geeigneten Wirtsstammes angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4° C für 5 min bei 4300 rpm abzentrifugiert, in 30 mL kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis belassen. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 4 mL kaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert und jeweils 100 µL Aliquots kompetenter *E. coli*-Zellen wurden in sterile Reaktionsgefäße abgefüllt und entweder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70° C gelagert oder auf Eis belassen und direkt zur Transformation verwendet.

2.2.1.4 Herstellung kompetenter *P. pastoris*-Zellen

Zur Plasmidtransformation in *P.pastoris* wurden elektrokompetente *P.pastoris* Zellen (KM71H) verwendet. Hierzu wurde zunächst eine 10 mL Schüttelkolbenkultur mit YPD

Medium ü.N. bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Von der Suspensionskultur wurden max. 0,5 mL verwendet, um 500 mL YPD Medium in einem 2 L Schüttelkolben zu beimpfen. Die Inkubation erfolgte erneut ü.N. bei 30°C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min, bei 1500 xg und 4°C geerntet und in 500 mL eiskaltem, sterilem H₂O resuspendiert. Dieser Waschzyklus wurde ein zweites Mal wiederholt, bevor die Zellen in 20 mL eiskaltem, sterilem 1M Sorbitol resuspendiert und erneut zentrifugiert wurden. Abschließend wurden die Zellen in 2 mL 1M Sorbitol resuspendiert (4°C) und direkt zur Transfomation eingesetzt.

2.2.1.5 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifikation von Gensegmenten mittels PCR wurde Taq Polymerase (Combizym) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) bezogen.

Reaktionsansatz:

5	µL	10x Reaktionspuffer + MgSO ₄
5	µL	dNTP-Mix (10 mM)
2,5	µL	Primer A (c = 20 pmol/µL)
2,5	µL	Primer B (c = 20 pmol/µL)
10-100	ng	Template-DNA
0,5	µL	Taq-Polymerase (1,25 U)
x	µL	steriles ddH ₂ O
50	µL	Gesamtvolumen

Programmablauf:

1	min	94° C	Denaturieren der Template-DNA	
30	sec	94° C	Denaturieren	
30	sec	55° C	Primer-Annealing (Temp. und Zeit variabel)	
x	min	72° C	Synthese (Zeit variabel, Richtwert 1 min/1000 bp)	25 Zyklen
7	min	72° C	Endsynthese	

Abschließend kühlte das Gerät auf 16° C herunter und behielt diese Temperatur bis zum Ausschalten bei. Die Zeit und Temperatur beim Primer-Annealing richtete sich nach dem GC-Gehalt des verwendeten Oligonucleotids. Die Syntheszeit war von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der verwendeten Polymerase abhängig.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Molekülen nach erfolgter Restriktion oder PCR wurde über Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Mit Hilfe eines Größenmarkers erfolgte die Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente. Für die Detektion unter UV-Licht wurde dem Gel, bestehend aus 1x TAE-Puffer und Agarose (0,8-2%), Ethidiumbromid (3 µL/100 mL TAE-Puffer) zugegeben.

2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die aus einer präparativen Gelelektrophorese ausgeschnittenen Gelstücke bzw. DNA-Fragmente wurden mit den Kits GFX (Amersham) aufgereinigt. Für die Elution der gereinigten DNA-Fragmente wurde H₂O verwendet.

2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das GFX micro Plasmid prep Kit (Amersham) verwendet.

2.2.1.9 Reinigung und Präzipitation von DNA

Die Reinigung bzw. Präzipitation von DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender DNA-Präzipitation mit Ethanol. Hierzu wurde die DNA Lösung zur Volumenvergrößerung der wässrigen Phase mit TE Puffer auf 200 µL aufgefüllt, mit 200 µL Phenol/Chloroform versetzt und für 1 min gevortext. Die nachfolgende Zentrifugation fand bei RT und 15000 rpm für 5 min statt. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die DNA mit 20 µL 3 M NaAcetat pH 5,5 und 400 µL 96 %igem Ethanol für mindestens 1 h bei –20° C gefällt und dann pelletiert (15000 rpm, 15 min, 4° C). Das Pellet wurde mit 200 µL 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15000 rpm, 3 min, 4° C). Anschließend wurde das Pellet für 10 min unter der Cleanbench getrocknet und in 10-20 µL TE oder sterilem ddH₂O gelöst.

2.2.1.10 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen wurden zur Spaltung von DNA mit den entsprechenden Puffern bzw. Zusätzen gemäß den Angaben der Hersteller (NEB und MBI Fermentas) eingesetzt. Dabei wurde zwischen analytischem und präparativem Verdau unterschieden

Analytischer Verdau:

0,5	µg	DNA
1	µL	10x Reaktionspuffer
1-2	U	Enzym
0,1	µL	BSA-Lösung
x	µL	steriles ddH ₂ O
10	µL	Gesamtvolumen

Präparativen Verdau:

5	µg	DNA
5	µL	10x Reaktionspuffer
3	U	Enzym
0,5	µL	BSA-Lösung
x	µL	steriles ddH ₂ O
50	µL	Gesamtvolumen

Die Dauer variierte zwischen ca. 3 h für einen analytischen und bis zu 6-8 h bzw. ü.N. für einen präparativen Verdau bei 37° C.

2.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation entstehen kovalente Phosphodiesterbindungen zwischen den komplementären Enden von Insert und Vektor. Diese Reaktion wird von der T4-Ligase unter ATP-Hydrolyse katalysiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4° C oder alternativ bei RT für 4 h.

Zusammensetzung eines Ligationsansatzes:

0,5-1	µg	Insert-DNA
30-50	ng	Vektor-DNA
1	µL	10x Ligationspuffer
0,5	U	T4-Ligase
x	µL	steriles ddH ₂ O
10	µL	Gesamtvolumen

2.2.1.12 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in die chemisch-kompetenten *E.coli*-Zellen eingebracht, wobei die Zellen einem Hitzeschock unterzogen werden. Erfolgte die Transformation mit gereinigtem, konzentriertem Plasmid, so gelten die in Klammern angegebenen Angaben. 100 µL (≥ 25 µL) kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100 ng (0,1 ng) der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde für weitere 30 min auf Eis belassen. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42° C mit anschließender Kühlung der Zellen auf Eis für 3 min. Nach der Zugabe von 600 µL (800 µL) LB-Flüssigmedium wurden die Zellen für 30 bis 60 min bei 37° C geschüttelt. 200 bzw. 500 µL (50 µL) des Transformationsansatzes wurden auf zwei Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 37° C inkubiert.

2.2.1.13 Transformation von *P.pastoris*

Für die Transformation von *P.pastoris* wurden ~10µg mit *PmeI* linearisiertes Plasmid verwendet. Dazu wurden ca. 80 µL der elektrokompenten Zellen mit dem Plasmid vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 µm; Biorad) überführt wurde. Die Elektroporation erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers. Direkt im Anschluss wurde der Elektroporationsansatz in 1 mL eiskalten 1 M Sorbitol resuspendiert, in ein 15 mL Falcon überführt und für mind. 1 h bei

30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf YPD-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und für mind. 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.1.14 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Doppelsträngige DNA weist bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf, so dass bei dieser Wellenlänge eine photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgen kann. In einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) wurden 147 µL ddH₂O mit 3 µL der zu vermessenden DNA-Lösung gemischt und die Extinktion mit ddH₂O als Referenz bestimmt. Die Konzentration der DNA-Lösung berechnete sich wie folgt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

mit A_{260} = Absorption bei 260 nm in AU

2.2.1.15 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktion (PCR):

2	µL	Sequenzierprimer (c = 2 pmol/µL)
1,5	µL	Premix (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit)
x	µL	H ₂ O
150 -200	ng	hochreine DNA
10	µL	Gesamtvolumen

Programmablauf:

10	sec	96° C	Denaturieren	25 Zyklen
5	sec	50° C	Primer-Annealing	
4	min	60° C	Synthese	

Zur Entfernung der Primer und d(d)NTPs wurde die DNA wie folgt gefällt:

Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 20 µL aufgefüllt. Eine vorbereitete Lösung aus 48 µL reinem Ethanol und 2 µL 3 M Natriumacetat pH 4,8 wurde gut mit dem verdünnten Reaktionsansatz gemischt. Die Fällung erfolgte für mindestens 10 min bei RT. Nach dem Pelletieren der gefällten DNA (15300 rpm, 30 min, RT) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zum Waschen in 250 µL 70 %igem Ethanol resuspendiert. Die DNA wurde erneut zentrifugiert (15300 rpm, 10 min, RT) und das getrocknete Pellet in 15 µL Template Suppression Reagent (KIT) aufgenommen. Die Probe wurde für 2 min bei 90° C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und in 0,5 mL Genetic Analyzer Sample Tubes überführt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Langen).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 ProteinA-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von Antikörpern bzw. Antikörperfusionen, die über eine Fc-Region (IgG₁) verfügen, eignet sich die Affinitätschromatographie mit ProteinA. Hierzu wurden bereits vorgepackte 1 mL Säulen (HiTrap Protein-A-Sepharose; Amersham) verwendet. Dazu wurde die Säule mit ca. 20 mL filtriertem (0,2 µm) Waschpuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0) voräquilibriert. Nachfolgend wurde der ebenfalls filtrierte Kulturüberstand der Antikörperexpression, mit einer Flussrate von 1 mL/min über die Säule geleitet. Die Säule wurde mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen, bevor die gebundenen Antikörpermoleküle mit 12,5 mM Citrat-Puffer pH 2,6 eluiert wurden. Die Fraktionierung erfolgte mit 1 mL-Schritten, wobei zwecks Anpassung an einen physiologischen pH-Wert jeweils 50 µL 2M Tris-HCl pH 9,0 vorgelegt wurden. Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft, entsprechend vereinigt und gegen PBS dialysiert.

2.2.2.2 ProteinL-Affinitätschromatographie

ProteinL eignet sich zur affinitätschromatographischen Reinigung von Antikörpern mit einer leichten Kette aus der Kappa-Familie (Subfamilien I, III und IV). Zur Aufreinigung wurde eine selbstgepackte 2 mL Säule mit ProteinL-Agarose (Pierce) verwendet, welche zunächst mit 20 mL filtriertem (0,2 µm) Waschpuffer (0,1 M Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl) äquilibriert wurde, bevor der filtrierte Kulturüberstand der Antikörperexpression mit einer Flussrate von 1 mL/min über die Säule geleitet wurde. Anschließend wurde mit weiteren 20 mL Waschpuffer die Säule gespült und über eine pH Senkung mit 0,1 M Glycinpuffer pH 2,5 wurden die gebundenen Antikörpermoleküle eluiert. Dabei erfolgte eine Fraktionierung des Eluats in 1 mL Volumina, deren pH Wert wie bei der ProteinA Aufreinigung mit 50 µL 2M Tris-HCl pH 9,0 angepasst wurde. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft, entsprechend vereinigt und gegen PBS dialysiert.

2.2.2.3 Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde entweder im analytischen Maßstab über eine Superdex 200 10/300 GL Säule oder im präparativen Maßstab über eine Supredex 200 HiLoad16/60 Säule durchgeführt. Beide Säulen waren an einer Äkta basic bzw. Äkta Purifier (Amersham) angeschlossen und wurden mit einer Flussrate von 1 mL/min (PBS, pH 7,2) betrieben und

mit entsprechenden Größenmarkern (Gelfiltration LMW Calibration Kit, Amersham) kalibriert. Es fand eine Fraktionierung der Proteinproben in 1 mL Volumina statt. Mittels UV-Detektor wurde die Absorption bei 280 nm gemessen.

2.2.2.4 Proteinquantifizierung nach Bradford

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Verfahren nach Bradford angewandt. Hierzu wurde Bradford-Reagenz (Biorad) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet.

2.2.2.5 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Die Affinitätsmessung und Bestimmung der k_{on} und k_{off} Raten der Antikörper wurde am Biacore 2000 bei 25°C durchgeführt. Hierzu wurden an die Flusszellen rekombinantes CD30-Fc-Protein für die eigentliche Antigen-Antikörperbindung bzw. BSA als Negativkontrolle gekoppelt. Die kovalente Bindung an die Flusszellen erfolgte über Ethanolamin und NHS. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Flussrate von 25 μ L/min mit HEPES-Puffer pH 7,4. Für die Regeneration des Chips wurden nach jeder Messung 20 μ L 10 mM NaOH injiziert. Pro Konstrukt wurden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen vermessen, wobei eine Konzentration zweifach zur Reproduzierbarkeit des Sensogramms analysiert wurde. Bei der Auswertung der Kurven und Bestimmung der Konstanten wurden mit der BIAevaluation u.a. entsprechende Effekte wie Avidität bei bivalenten Antikörperformaten berücksichtigt.

2.2.2.6 Antigen-ELISA

Mittels Antigen-ELISA kann die Spezifität von Antikörpern auch bei geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Hierzu wurden 100 μ L Antigen mit Konzentrationen von 100 ng/well (CD30-Fc) bis 1 μ g/well (Lysozym, BSA), gelöst in 50 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9,6, in 96-well Mikrotiterplatten ü.N. bei 4°C immobilisiert. Die Platten wurden mit 300 μ L 10% FCS/PBS für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert und später dreimal mit PBST gewaschen. Die Proben (Kulturüberstände oder aufgereinigte Antikörper) wurden mit einem max. Volumen von 100 μ L/well für 1 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss erneut dreimal mit PBST gewaschen. Die Detektion erfolgte für alle Konstrukte (CD30-spezifische Antikörper und

D1.3-scFab) direkt über HRP-gekoppeltes ProteinL mit 100 µL/well und einer Konzentration von 200 ng/mL in 10% FCS/PBS. Für den Nachweis von D1.3scIgG wurde 100 µL/well HRP-gekoppelter α-human IgG (Fc spezifisch) Antikörper aus Ziege (Sigma) 1/60000 verdünnt in 10% FCS/PBS. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei 37°C und dreimaligem Waschen mit PBST, wurden 100 µL TMB Peroxidase Substrat zupipettiert und der ELISA für max. 30 min bei RT entwickelt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL 1N H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm am TECAN Sunrise ELISA Reader gemessen.

2.2.2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Ladepuffer enthält Natriumdodecylsulfat, welches über eine negative Eigenladung verfügt und an die hydrophoben Bereiche der Proteine bindet. Aufgrund der negativen Eigenladung des SDS kann die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigt werden. Die Proben werden mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 92°C erhitzt. In die Geltaschen wurden 15 µL Probe aufgetragen. Um eine verbesserte Auftrennung zu erreichen, wird die Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen pH durchgeführt. Dabei wird durch das Trenngel (8-15%) und ein großporiges Sammelgel (3%), welches einen um zwei Einheiten niedrigeren pH-Wert besitzt als das Trenngel, eine Konzentrierung der Proteinproben ermöglicht. Als Ampholyt wird Glycin verwendet. Der Lauf erfolgte bei 25 mA für 50 min. Anschließend wurde entweder das Gel direkt gefärbt (Coomassie- oder Silberfärbung) oder für die Immunodetektion geblottet.

2.2.2.8 Coomassie-Blue-Färbung

Die Sensitivität der Coomassie-Blue-Färbung liegt bei 0,1 µg Protein/Bande. Das Proteingel wurde zunächst für mindestens 1 h in der Färbelösung inkubiert, der zusätzlich Essigsäure und Isopropanol zugesetzt war, um die Proteine im Gel zu fixieren. Zur Entfärbung des Hintergrunds und zur Erkennbarkeit der Proteinbanden wurde das gefärbte Gel in einem Essigsäure/Isopropanolgemisch inkubiert, wobei durch mehrfaches Wechseln der Lösung der Prozess beschleunigt wurde.

2.2.2.9 Silberfärbung

Die Methode der Silberfärbung erlaubt einen sehr sensitiven Nachweis von Proteinen ab einer Menge von ca. 20 ng/Bande. Das Polyacrylamidgel wurde zunächst 5 min in Fixierer I geschwenkt, dann 5 min in Fixierer II. Nach dreimaligem Waschen mit 60°C warmen H₂O, folgte eine kurze Inkubation für 30 sec in der Reduktionslösung. Im Anschluss wurde das Gel intensiv mit 60°C warmen H₂O gewaschen und für weitere 12 min in Färbelösung inkubiert. Später wurde das Gel erneut mit H₂O gewaschen und zweimal 30 sec mit Entwicklerlösung gespült, bevor es schließlich in der Entwicklerlösung belassen wurde bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Zum Abstoppen der Entwicklung wurde das Gel mit Stopplösung gespült.

2.2.2.10 Western-Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine zwecks Immunodetektion auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Visualisierung der Proteinbanden geschieht durch geeignete Antikörper bzw. Antikörper-Enzym Konjugate. Der Transfer wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt, wobei eine Stromstärke von 7,5 mA pro cm² Membranfläche und eine Spannung von 20 V für 40 min angelegt wurde. Nachfolgend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membranoberfläche durch 1 h Inkubation bei RT mit PBS-M abgeblockt. Später wurde die Membran 3-mal mit PBS gewaschen und mit für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörpern (z.B. bei Detektion über humane pankreatische RNase A mittels Kaninchen-Serum gegen Peptid RNase A 1/1000 verdünnt in PBS-M) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschschrift wurde der sekundäre Detektionsantikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, (z.B. muriner mAk α -Kaninchen-IgG-AP-Konjugat) wiederum für 1 h bei RT inkubiert, gefolgt von mehrmaligem Waschen. Anstelle einer indirekten Detektion über zwei Antikörper wie bei der RNase erforderlich wurde in dieser Arbeit i.d.R. eine direkte Detektion über die humane Fc Region der Fusionsmoleküle vorgenommen (Ziege- α -human-IgG (Fc-spezifisch) Antikörper-AP-Konjugat). Die Entwicklung des Blots erfolgte in 10 mL Substratpuffer, dem zuvor jeweils 100 μ L NBT bzw. BCIP zugesetzt wurden.

2.2.2.11 N-terminale Sequenzierung

Proteinproben, die zur Bestimmung der Aminosäuresequenz N-terminal ansequenziert werden sollten, wurden zunächst mit 5x Laemmli-Puffer bzw. 10 min bei 95°C aufbereitet und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinmenge sollte dabei zwischen 1-2 μ g betragen.

Dann wurde die aufgetrennte Proteinprobe vom Gel auf eine PVDF Membran im Semi-Dry Verfahren transferiert (Kap. 2.2.2.10). Im Anschluss wurde die Membran erst mit Coomassie-Blue Lösung für max. 30 min gefärbt und später der überschüssige Farbstoff durch Waschen mit Entfärberlösung entfernt. Die Membran wurde mit H₂O nachgewaschen und getrocknet. Später wurden die gefärbten Proteinbanden ausgeschnitten und zum Sequenzieren gegeben (GBF, Arbeitsgruppe Prof. Dirk Heinz).

2.2.2.12 RNase Aktivitätsmessungen

Für die Messung der RNase-Aktivität wurde ein *in vitro* Translationssystem verwendet, bei dem eine Reporter-mRNA, in diesem Fall kodierend für die Luciferase, translatiert wird. In Gegenwart von RNase wird die Proteinsynthese gestört, da die RNase in Abhängigkeit von ihrer Aktivität und Spezifität mRNA, tRNA und rRNA degradiert.

Folgender Master-Mix war ausreichend für 4 Ansätze: 35 µL Rabbit Retikulozytenlysat mit 0,5 µL, 1 mM Aminosäurenlösung (ohne Methionin) und 0,5 µL, 1 mM Aminosäurenlösung (ohne Leucine) mit 2 µL Luciferase mRNA (1 µg/µL). Zu dem jeweiligen Translationsansatz wurden 3 µL der zu messenden Probe (2,5 µM) zugegeben und anschließend für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Wahlweise wurden die Proben mit dem RNase-Inhibitor RNasin (20 Units) versetzt.

Zur nachfolgenden Lumineszenzmessung wurden die Translationsansätze 100-fach mit PBS pH 7,4 verdünnt und mittels Luciferase Reporter Assay Kit vermessen. Dazu wurden jeweils 100 µL Substrat A bzw. Substrat B in Mikrotiterplatten vorgelegt (Firma Nunc) und mit 2 µL Probe vermischt. Die Messung erfolgte am Luminometer bei 562 nm.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Lagerung von Säugerzellen

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte in den Kulturmedien gemäß Kap. 2.1.1.3 in einem Inkubator bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (Ausnahme Hek293T Zellen bei 7% CO₂). Zur Passagierung der Zellen wurde die adhärent bzw. semi-adhärent wachsenden Hek293T bzw. HD-MY-Z Zelllinien mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Petrischale abgelöst. Jurkat und Karpas Zellen konnten direkt aus den Suspensionskulturen abgeerntet werden. Die Zellen wurden bei 1200 rpm abzentrifugiert und im Kulturmedium mit der geeigneten Zelldichte resuspendiert und ausgesät. Zur Kryokonservierung wurden Zellen geerntet (s.o.) und mit Zelldichten von ~5x10⁶/mL in dem

entsprechenden Kulturmedium, mit 10% DMSO und 20% FCS als Zusätze, verdünnt und auf 2 mL Kryoschraubgefäße verteilt. Um ein langsames Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden die Schraubgefäße für zwei Tage in einem isolierten Behälter bei -70°C aufbewahrt, bevor sie in flüssigen N₂ transferiert wurden.

2.2.3.2 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, wobei durch Trypanblaufärbung (0,25%-Lösung) mit Anreicherung des Farbstoffs in toten Zellen eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen gemacht werden konnte. Alle 4 Großquadrate wurden zur Ermittlung eines Mittelwertes ausgezählt, so dass sich die Zellzahl pro mL wie folgt ergab:

$$[\text{Zellen/mL}] = [\text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Großquadraten}] \times [\text{Verdünnungsfaktor}] \times 10^4$$

2.2.3.3 Transfektion von Säugerzellen

Hek 293T Zellen wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Glucose 4,5 g/L, 8% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur Transfektion wurden die Zellen je nach Ausmaß der Produktion in 6-well Flachbodenplatten oder 10 cm Petrischalen (Greiner) angezogen. Die Durchführung der Plasmidtransfektion wurde HekFectin Reagenz (Biorad) gemäß den Vorschriften des Herstellers im serumfreien Medium (OPTIMEM1) verdünnt und mit dem zu transfizierenden Plasmid nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Frühestens 48 h nach erfolgter Transfektion wurden Proben zur Analyse mittels ELISA und Immunoblot genommen.

2.2.3.4 Durchflusszytometrie

Semiadhärent wachsende HD-MY-Z Zellen und in Suspension wachsende Karpas299 Zellen wurden gezählt und auf 10⁶ Zellen pro 15 mL Falcon eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit kaltem PBS/BSA (2%) à 10 mL gewaschen und bei 250 xg 10 min 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die verschiedenen aCD30scFv-Fc-Konstrukte (mit/ohne RNase-Fusion) in 100 µL und einer Konzentration von ~10 µg/mL (in PBS/2%BSA verdünnt) mit den Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Parallel wurde der chimäre IgG₁ 215 als Isotypenkontrolle mitgeführt. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit kaltem PBS/BSA (2%) à 10 mL gewaschen und zentrifugiert. Die Detektion erfolgte mittels murinem α-human-IgG (Fc spezifisch) FITC-konjugiertem Antikörper (100 µL; 1/400 mit

PBS/BSA verdünnt) (Sigma). Die Dauer der Inkubation auf Eis betrug wiederum 30 min, bevor erneut dreimal gewaschen und zentrifugiert und die Zellen in 500 µL PBS/BSA resuspendiert wurden. Die Messung und Auswertung der Zellen erfolgte am FC500 (Beckman Coulter).

2.2.3.5 ADCC

Die Durchführung des ADCC bedarf der vorherigen Isolierung und Aktivierung von Effektorzellen. Bei diesen Zellen handelt es sich im Wesentlichen um NK-Zellen und CTLs. Sie wurden aus humanen Blutproben (Buffy coats) isoliert, die von Herrn Dr. Garritsen (Klinikum Braunschweig) bereitgestellt wurden.

2.2.3.5.1 Isolierung und Aktivierung von Effektorzellen / PBMCs

Zur Isolierung von humanen peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs) aus Blut wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (Amersham) durchgeführt. Die gesamte Aufarbeitung fand bei 20°C statt. Dazu wurden 50 mL Falcon-Röhrchen zunächst mit 15 mL Ficoll befüllt und anschließend wurde es mit 35 mL Blut, welches zuvor 1:1 mit PBS 2 mM EDTA verdünnt wurde, überschichtet. Es folgte eine 40-minütige Zentrifugation mit Ausschwingrotor bei 400 xg ohne Abbremsen. Die PBMCs, die sich in der Interphase ansammeln, wurden abgenommen und in 50 mL PBS 2 mM EDTA resuspendiert und bei 300 xg für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde ein Erythrozyten-Lyseschritt mit 25 mL Erythrocytenlysepuffer (Anhang) für 5 min und Resuspension der Zellen durchgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) und zweimaligem Waschen mit 50 mL PBS, 2 mM EDTA gefolgt von Zentrifugation bei 300 xg für 10 min wurden die Zellen in RPMI-Medium, 20% FCS, 1% P/S, mit einer Zelldichte von $\sim 10^5$ - 10^6 Zellen/mL für 4 Tage in Kultur bei 37°C, 5% CO₂, genommen. Im Laufe dieser 4 Tage wurden die Zellen mit humanem 30 U/mL IL-2 aktiviert.

2.2.3.5.2 ADCC-Analyse

Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wurde anhand eines colorimetrischen Tests (Roche) basierend auf der Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) bei Apoptose von Zellen gemessen. Aufgrund des störenden Einflusses vorhandener LDH Aktivität im FCS des Mediums wurde generell RPMI-Medium mit einem reduzierten FCS Gehalt (1%) verwendet.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität war es nötig, die spontane Lyse der Effektorzellen (PBMCs) bzw. Targetzellen (Karpas bzw. HD-MY-Z), die maximale Lyse der Targetzellen und die LDH-Aktivität im Medium zu ermitteln. Zusätzlich wurde innerhalb eines Ansatzes neben der ADCC eine mögliche antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität (AICC) bestimmt.

Zunächst wurden sowohl die Targetzellen als auch Effektorzellen zur Entfernung von LDH im Kulturüberstand dreimal intensiv mit RPMI/FCS gewaschen. Im Anschluss wurden die Targetzellen CD30⁺ Karpas 299 und als Negativkontrolle CD30⁻ HD-MY-Z Zellen mit 100 µL 5*10⁵ Zellen/mL vorgelegt und für 30 min mit dem Antikörper (1 µg/mL) bei 37°C, 5% CO₂ vorinkubiert. Danach wurden die Effektorzellen (NK/CTLs) mit weiteren 100 µL in Effektorzellen/Targetzellen-Verhältnissen (E/T) von 3 bis 100-fach zugegeben und für weitere 4 h inkubiert. Es wurden jeweils Triplikat-Bestimmungen durchgeführt. Zur Messung der maximalen LDH Freisetzung wurde den entsprechenden Proben 10 µL 20% Triton X-100 zupipettiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 250 xg für 10 min abzentrifugiert und 100 µL Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt. 100 µL Reaktionslösung pro Well wurden zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte mit 50 µL, 1N HCl. Die Messung der Absorption fand bei 492 nm bzw. 600 nm als Referenzwellenlänge am ELISA-Reader (Teacan Sunrise) statt.

Die Zytotoxizität berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zytotoxizität[\%]} = \frac{[AU_{492nm}(E + T) - AU_{492nm}(E_{\text{spontan eLyse}}) - AU_{492nm}(T_{\text{spontan eLyse}})]}{[AU_{492nm}(T_{\text{max.Lyse}}) - AU_{492nm}(T_{\text{spontan eLyse}})]}$$

E:	Effektorzellen (PBMCs)
T:	Targetzellen (Karpas 299 bzw. HD-MY-Z)
E _{spontane Lyse} :	spontane Freisetzung von LDH durch Effektorzellen
T _{spontane Lyse} :	spontane Freisetzung von LDH durch die Targetzellen
T _{max Lyse} :	maximale mögliche Freisetzung von LDH durch Totallyse der Targetzellen mit Detergenz

2.2.3.6 Internalisierungsassay der Targeted RNase mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie

Die Untersuchung bzw. Verifizierung der Bindung und Internalisierung der *Targeted RNase* Konstrukte an CD30 positive Zellen erfolgte anhand Fluoreszenzmikroskopie bzw. mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskops. Hierzu wurden die Suspensionszellen (CD30⁺ Karpas) in einer 24-well Zellkulturplatte mit 5x10⁵ Zellen/well und 250 µL RPMI Medium inkubiert. Die semi-adhären HD-MY-Z Zellen (CD30⁻) ließ man bis zu einer Konfluenz von 50-75% in RPMI-Medium auf Deckgläsern anwachsen. Die Applikation der *Targeted RNase*

erfolgte für 1 h mit einer Konzentration von 10 µg/mL. Zusätzlich wurden Internalisierungsansätze bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (37°C und 4°C), um die aktive Aufnahme zu verfolgen. Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst mehrfach mit PBS gewaschen, für mind. 1 h auf dem Deckglas getrocknet und anschließend mit Paraformaldehyd/PBS für 15 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte nach einem erneuten Waschen mit PBS durch 5-minütige Inkubation mit 0,2% Triton X-100/PBS bei RT. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen werden die fixierten und permeabilisierten Zellen mit 2%BSA/PBS bei 37°C inkubiert. Die Detektion der *Targeted RNase* erfolgte für 1 h bei 37°C über FITC-markierten α-human-IgG (Fc-spezifisch) Antikörper aus Ziege (Sigma), der 1/300 mit 2%BSA/PBS verdünnt wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI-Lösung (1 µg/mL; Pierce) für 5 min bei RT. Nach erneutem intensiven Waschen mit PBS wurden die Deckgläser getrocknet und auf Objektträgern mit Mowiolösung versiegelt.

2.2.3.7 Proliferations-Assay

Mit Hilfe des Proliferations-Assays wurde die Inhibierung der Proliferation durch *Targeted RNase* verfolgt und verifiziert. Dazu wurden Karpas 299 Zellen und HD-MY-Z Zellen mit jeweils 10⁴ Zellen/well à 100 µL RPMI Medium (8% FCS, 1% P/S) in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen (0-100 nM) inkubiert. Jede Konzentration wurde in Triplikaten angesetzt. Die Zellen wurden für weitere 72 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl, wobei zur Differenzierung von toten und lebenden Zellen Trypanblau eingesetzt wurde.

3 Ergebnisse

Ausgangspunkt für die *Targeted RNase*-Konstrukte war ein über Antikörperphagendisplay isolierter CD30-spezifischer scFv-Antikörper, der mit „αCD30(4E3)scFv“ bezeichnet wurde (von Dr. Konthur zur Verfügung gestellt). Der Antikörper entstammt einer semi-synthetischen scFv-Phagenbibliothek (Tomlinson I und J Bibliothek, MRC HGMP Resource Centre), die auf einem konservierten humanen Framework basiert, das aus den Keimbahngen V3-23/DP-47 mit J_H4b für V_H und O12/O2/DPK9 mit J_K1 für V_L abgeleitet wurde. Die Bibliothek hat eine theoretische Diversität von ca. $2,8 \times 10^8$. Die genetische Information der V_L und V_H Domäne des über Phagendisplay isolierten CD30 spezifischen Antikörpers diente der Erzeugung unterschiedlicher Antikörperformate und *Targeted RNase*-Konstrukte (TR). Diese TR-Konstrukte wurden nach Produktion in unterschiedlichen Expressionssystemen für die Verwendung im *Targeted RNase*-Konzept charakterisiert. Die humane pankreatische RNase stand über den Vektor pET11d-RNase-aTFR zur Verfügung (Zewe *et al.* 1997).

3.1 Konstruktion CD30 spezifischer Antikörperformate und *Targeted RNasen* Fusionsproteine

Es wurden insgesamt sechs verschiedene Konstrukte kloniert. Die erzeugten Formate waren: scFv, IgG, scFv-Fc, scFv-RNase, scFv-RNase-Fc und scFv-Fc-RNase (Abb. 3.1).

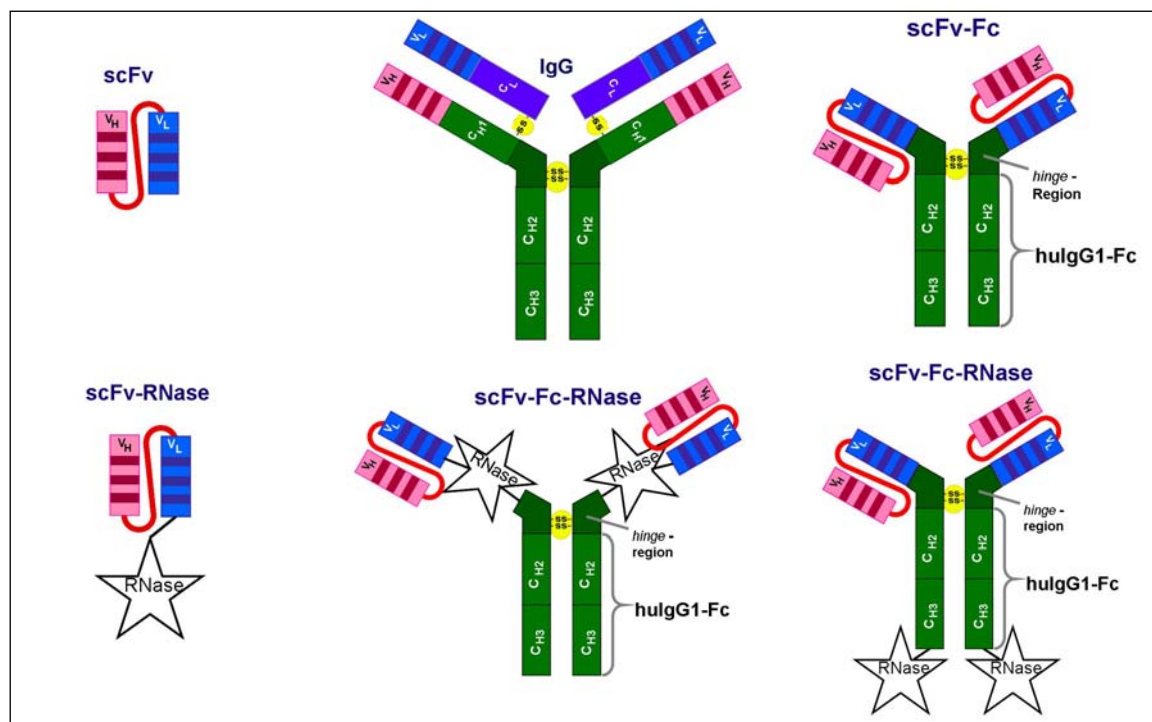


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau der CD30 spezifischen Antikörperformate und TR. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Antikörperformate waren scFv, IgG und scFv-Fc sowie die generierten TR scFv-RNase, scFv-RNase-Fc und scFv-Fc-RNase.

Die drei verschiedenen Antikörperformate (scFv, IgG und scFv-Fc) dienen zur Evaluierung des optimalen Antikörperformats für den Einsatz in *Targeted RNase*-Konstrukten. Die drei *Targeted RNase* Fusionskonstrukte wurden hinsichtlich ihrer Antigen-Bindungseigenschaften, der RNase-Aktivität und der für das TR-Konzept wichtigen Eigenschaften von Internalisierung und Zytotoxizität untersucht.

Die Konstrukte wurden in Expressionsvektorsysteme für *P.pastoris* (pPICZalphaA, Invitrogen) und Säugerzellen (pCMV-myc-ER, Invitrogen) kloniert. Das scFv-Format wurde nur in pPICZalphaA kloniert (Abb. 3.2).

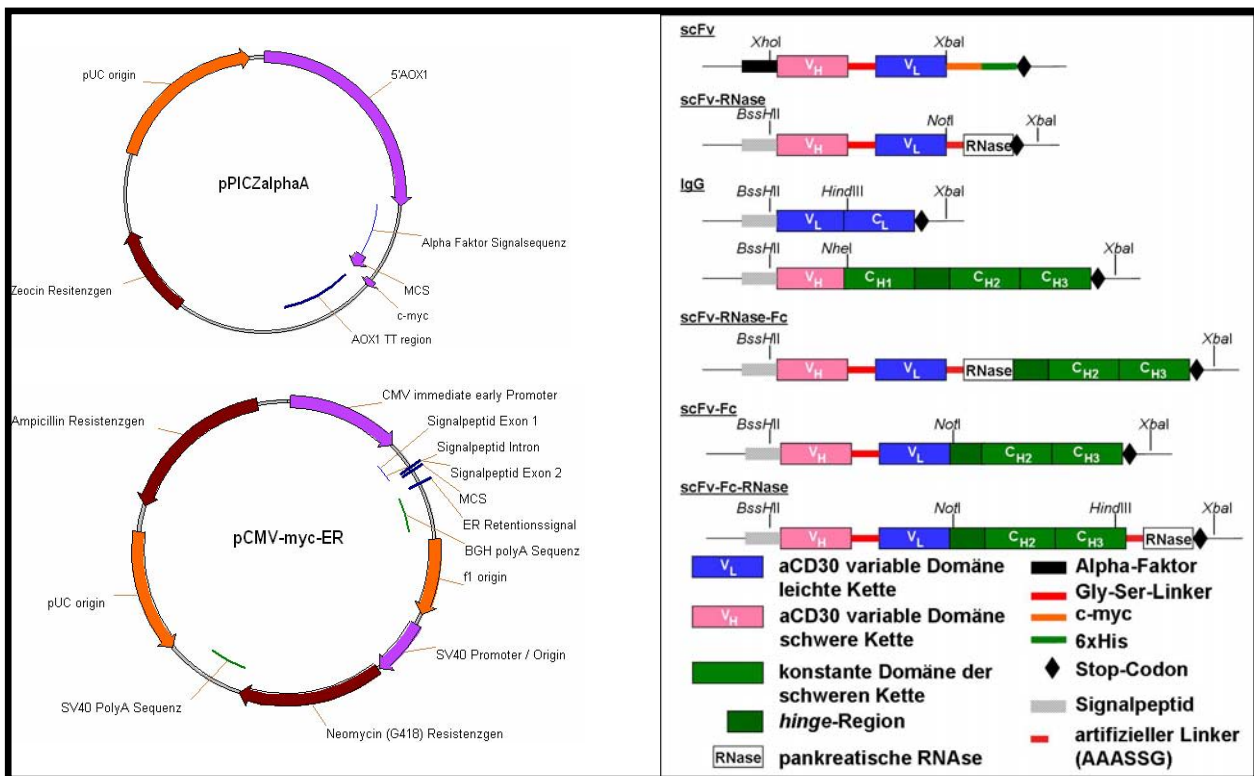


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pPICZalphaA (*P.pastoris*) und pCMV-myc-ER (Säugerzellen) und des Aufbaus der Antikörpergenkonstrukte. pPICZalphaA: Vektor zur sekretorischen Proteinexpression in *P.pastoris* unter Kontrolle des Alkoholoxidase1-Promotors AOX1. Die 5'AOX1-Region dient der Genintegration durch Rekombination; AOX1-TT verursacht die Transkriptionstermination und poly-Adenylierung. Der alpha-Faktor dient als Signalpeptidsequenz zur Sekretion. Das Sh-ble Gen (Zeocin-Resistenzgen) fungiert als Selektionsmarker. Der pUC Origin dient der Plasmid-Replikation in *E.coli*. pCMV-myc-ER: Vektor zur transienten und stabilen sekretorischen Proteinproduktion in Mammalia-Zellsystemen. Der CMV-Promotor (humaner Cytomegalovirus) ermöglicht hohe Expressionslevel. Der SV40 Promotor/Origin dient der Expression des Neomycin-Resistenzgens (zur Generierung stabiler Zelllinien) und episomaler Replikation in Säugerzellen, die das Large T-Antigen exprimieren. Die β -Lactamase (Ampicillin-Resistenzgen) dient als bakterieller Selektionsmarker. In die „multiple cloning site“ (MCS) wurden die rechts aufgeführten Antikörper bzw. Antikörper-RNase Fusionsproteine einkloniert.

Anhand des Phagemidvektors pIT2 mit α CD30(4E3)scFv (V_H-Linker-V_L) wurde mittels PCR unter Einführung der Restriktionsschnittstellen XhoI (5'-Ende) und XbaI (3'-Ende) das scFv-DNA Fragment amplifiziert. Die anschließende Restriktion und Ligation mit dem pPICZalphaA Vektor erfolgte über die Restriktionsschnittstellen XhoI und XbaI. Der Vektor

dient der sekretorischen Proteinexpression in *P.pastoris* unter Kontrolle des induzierbaren Alkoholoxidase1 (AOX1) Promotors. Das zu exprimierende Protein (hier: scFv) wird über homologe Rekombination mit Hilfe der benachbarten 5'AOX1-Region ins Hefegenom integriert. Als Selektionsmarker verfügt der Vektor über das *sh-ble*-Gen, welches Zeocinresistenz sowohl in *E.coli*, als auch transformierten Hefen vermittelt. Für die Termination der Transkription und die poly-Adenylierung der mRNA sorgt die 3'AOX1 TT-Region. Das für die Sekretion erforderliche Signalpeptid entstammt dem „alpha mating factor“ von *Sacharomyces cerevisiae* und befindet sich am N-terminus des scFv. Die Elemente c-myc und der (His)₆-tag dienen der Detektion bzw. Aufreinigung des Proteins.

Die weitere Klonierung der scFv-RNase in den Akzeptorvektor pCMV-myc-ER erfolgte in zwei Schritten. Erneut wurde der scFv kodierende Genabschnitt über PCR amplifiziert, wobei über die Oligonukleotide am 5'-Ende *BssHII* und am 3'-Ende *NotI* Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden. Nach erfolgter Restriktion wurden Akzeptorvektor und scFv ligiert. Die Klonierung der humanen pankreatischen RNase an das 3'-Ende des scFv kodierenden Genabschnitts wurde ebenfalls über PCR mit den zusätzlich erzeugten Restriktionsschnittstellen *NotI* (5'-Ende) und *XbaI* (3'-Ende) durchgeführt. Zudem wurde zwischen scFv und RNase ein sechs Aminosäuren (AAASSG) codierendes Linkerfragment erzeugt. Als DNA-Template für die RNase wurde das Plasmid pET11d-RNase-TFR verwendet. Die Vektorelemente des Akzeptorvektors pCMV umfassten dabei im Wesentlichen den „intermediate early“-Promotor des humanen Cytomegalovirus, ein von der murinen V_H Kette isoliertes Signalpeptid zur Sekretion des rekombinanten Proteins über das endoplasmatische Retikulum, den pUC Origin zur bakteriellen Replikation in *E.coli* und das β -Lactamasegen zwecks Ampicillinresistenz sowie den SV40 Promotor mit Neomycinresistenzgen zur Generierung stabiler Zelllinien und den SV40 Origin zur episomalen Replikation in Zelllinien, die das „SV40 large T Antigen“ exprimieren.

Die für das IgG-Format des CD30-spezifischen Antikörpers kodierende DNA der leichten und schweren Kette ist auf zwei unterschiedlichen Expressionsvektoren enthalten, d.h. die Ketten werden nach der Cotransfektion monocistronisch exprimiert. Für die Klonierung der leichten Kette wurde zunächst die konstante Domäne der leichten Kappa Kette aus dem bestehenden Vektor pSL1-215 (Li *et al.* 2006) mit humaner C_L-kappa über *HindIII* und *XbaI* in den pCMV-myc-ER Vektor umkloniert. Die cDNA der V_L des CD30-spezifischen scFv wurde mit Hilfe von PCR und den Restriktionsschnittstellen *BssHII* und *HindIII* zwischen das Exon des Signalpeptids und C_L-kappa kloniert. Die schwere Kette wurde in den Vektor pSH1-215 kloniert (Li *et al.* 2006), der auf pCMV-myc-ER basiert, wobei V_H-215 durch V_H-CD30 ausgetauscht wurde.

Zur Klonierung der scFv-Fc bzw. scFv-Fc-RNase kodierenden Genfragmente in den Vektor pCMV-myc-ER wurde zunächst ein Akzeptorvektor konstruiert, der über eine hinge-Fc

Region verfügt. Als Template diente ein Vektor mit chimären IgG₁ (pSH1-215), dessen hinge-Fc-Fragment mittels PCR amplifiziert und über *NotI* (5'-Ende) und *XbaI* (3'-Ende) in den pCMV Vektor einkloniert wurde. Bei dieser PCR wurde eine weitere Restriktionsschnittstelle (*HindIII*) nahe dem 3'-Ende eingeführt, die die Fusion weiterer Module/Domänen an den C-Terminus der C_H3 Region erlaubt. Im nächsten Klonierungsschritt wurde der scFv kodierende Genabschnitt wie bereits bei der scFv-RNase-Klonierung über die *BssHII* und *NotI*-Schnittstellen eingefügt. Zur weiteren Erzeugung des RNase-Fusions-Konstrukts wurde die cDNA für die humane pankreatische RNase über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* (5'-Ende) und *XbaI* (3'-Ende) in den pCMV scFv-Fc Vektor einkloniert.

Für die Erzeugung des scFv-RNase-Fc-Konstrukts konnte auf einen bereits bestehenden Vektor pCMV-scFv-RNase mit vorhandener *BamHI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende der RNase zurückgegriffen werden, so dass die mittels PCR amplifizierte hinge-Fc-Region über die generierten Restriktionsschnittstellen *BamHI* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende einkloniert werden konnte.

3.2 Klonierung von CD30 und Expression der extrazellulären Domäne als CD30-Fc Fusionsprotein

Für weitere Analysen wie Affinitätsbestimmungen durch Oberflächenplasmonresonanz und ELISA wurde das CD30 Antigen benötigt. Dazu wurden aus ca. 10⁷ CD30⁺ Jurkat Zellen Gesamt-RNA isoliert. Mit Hilfe eines randomisierten Hexameroligonukleotids wurde über RT-PCR die Erststrangsynthese durchgeführt. Anschließend erfolgte eine PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden für den Bereich der extrazellulären Domäne unter Zugabe von 8% DMSO für die Zweitstrangsynthese und die weitere Amplifikation des 1,1 kb großen DNA-Fragments (Abb. 3.3). Die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide verfügten über die Restriktionsschnittstellen *BssHII* und *NheI*, die eine direkte „in frame“-Klonierung am 5'-Ende des hinge-C_H2-C_H3 kodierenden Genabschnitts in den pCMV-Fc(hIgG₁)-Vektor ermöglichten. Die Expression des CD30-Fc Fusionsproteins erfolgte nach der Transfektion von HEK293T Zellen in vier 10 cm Gewebekulturschalen mit nahezu konfluenter Zellschicht. Die Überstände wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen alle 2 Tage geerntet und später über ProteinA-Sepharose aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert, entsprechend ihrer Konzentration gepoolt und gegen PBS dialysiert (Abb. 3.4). Die molare Masse der einzelnen CD30-Fc-Ketten wurde mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert und betrug ca. 100-120 kDa. Die molare Masse des Gesamtmoleküls entspricht aufgrund der Homodimerisierung über die Fc-Domäne 200 kDa bis 240 kDa. Die Proteinausbeute betrug 520 µg aus vier 10 cm Schalen.

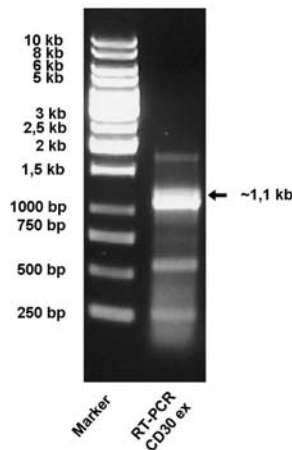


Abb. 3.3: DNA-Agarosegel der Zweitstrangsynthese und Amplifikation der cDNA von CD30 (extrazelluläre Domäne). Neben einigen anderen schwachen DNA-Banden ist die dominante CD30 cDNA-Bande mit ca. 1,1 kb sichtbar.

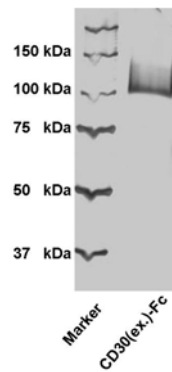


Abb. 3.4: Analyse des aufgereinigten rekombinanten CD30-Fc-Fusionsproteins. Reduzierte SDS-PAGE (10%, Silberfärbung) der gepoolten Elutionsfraktionen ProteinA aufgereinigter Expressionsüberstände des CD30-Fc Proteins. Die deutlich sichtbare Bande verläuft bei 100 kDa.

3.3 Expression der verschiedenen Antikörperformate und TR-Fusionsproteine

Für die Herstellung des α CD30(4E3)-scFv wurde *P.pastoris* als Expressionsorganismus gewählt. Nach der erfolgten Transformation des Expressionsplasmids in den *P.pastoris* Stamm KM71, wurde über YPD-Platten mit 100 μ g/mL Zeocin Klone selektioniert, die die Expressionskassette stabil integriert hatten. Um Klone zu identifizieren, die u.U. multiple Genintegrationen aufweisen oder ein besonders hohes Sekretionsvermögen des scFvs aufweisen, wurde eine Screening im 96well-Format mit 500 μ L BMGY-Medium bei 30°C durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte 24 h später durch einen Medienwechsel mit BMMY/Methanol. Die Inkubation wurde für weitere 48 h bei 30°C fortgesetzt, bevor die Kulturüberstände auf löslichen und funktionellen α CD30-scFv im ELISA untersucht wurden. Im ELISA zeigten 73 von 92 untersuchten Klonen ein vergleichbar hohes Signal bzw. Expressionslevel. Die restlichen Klone gaben kein oder nur ein geringes ELISA-Signal (Daten nicht gezeigt). Die Klone mit dem höchsten Signal im Antigen-ELISA wurden jeweils in 1 L Schüttelkolben unter den gleichen Bedingungen wie im Screening exprimiert.

Sämtliche anderen Antikörperformate wurden im Säugerzellexpressionssystem mit HEK293T transient produziert. Für die Expression des jeweiligen Konstruktes wurden die adhärenenten 293T Zellen i.d.R. in 10 Petrischalen bis zu einer Konfluenz von 80-90% inkubiert, bevor die Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA in Verbindung mit Liposomen transfiziert wurden. Die Expression fand mindestens 3 Wochen lang mit Ernte inkl. Medienwechsel im 2-Tagesrhythmus statt.

3.4 CD30-Antigen-ELISA

Die produzierten Antikörper und *Targeted RNasen* wurden vor ihrer Aufreinigung bereits auf ihre Antigenbindungsaktivität im ELISA untersucht (Abb. 3.5). Zunächst wurde die ELISA-Platte mit rekombinantem CD30-Fc Antigen (100 ng/well) (Kap. 3.2) bzw. Lysozym (Negativkontrolle; 1 µg/well) beschichtet und nachfolgend mit M-PBS unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Kulturüberstände wurden in einer Verdünnung von 1/10 im ELISA eingesetzt. Zur Positivkontrolle wurde ein monoklonaler muriner CD30 spezifischer IgG verwendet. Die Detektion der gebundenen Antikörpermoleküle erfolgte mittels HRP-gekoppelten ProteinL. ProteinL eignet sich für die Detektion und Aufreinigung von Antikörpern, deren leichte Kette der Kappa-Familie (insbesondere Subfamilie κI, κIII, κIV) zugehört. Somit ist eine Detektion und Aufreinigung über Vkl des αCD30 Antikörpers 4E3 mit ProteinL möglich. Für die murine Positivkontrolle wurde ein HRP-gekoppelter α-Maus-IgG (Fc-spezifisch) Antikörper eingesetzt. Es konnte in den Kulturüberständen aller erzeugten Antikörperformate eine CD30-spezifische Bindungsaktivität nachgewiesen werden.

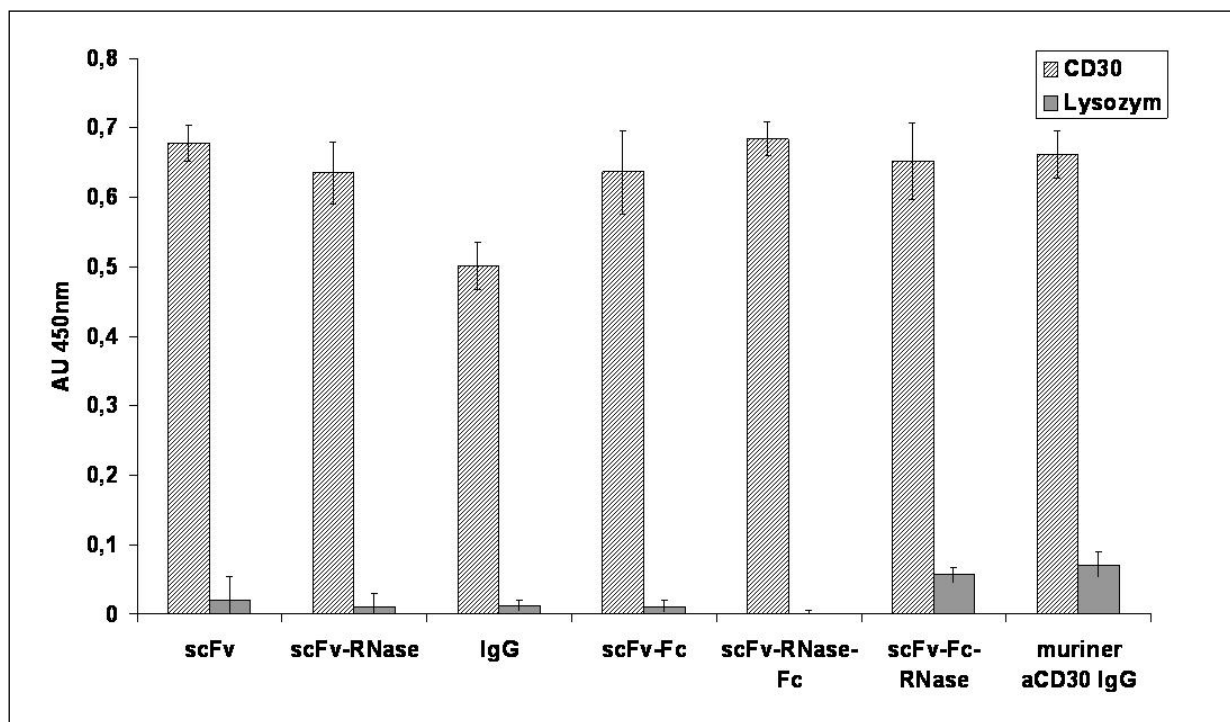


Abb. 3.5: ELISA mit CD30-Fc Antigen zur Analyse von Kulturüberständen der unterschiedlichen Antikörperkonstrukte. Sämtliche Kulturüberstände (1/10 verdünnt) von exprimierten Antikörpern und TR-Fusionsmolekülen wurden im Antigen-ELISA mit dem rekombinanten CD30-Fc als Antigen (Kap. 3.2) untersucht. Parallel wurde eine zusätzliche Positivkontrolle mit murinem αCD30-IgG inkubiert. Gebundene CD30-spezifische Antikörpermoleküle wurden mit ProteinL-HRP bzw. im Fall der Positivkontrolle mit HRP gekoppeltem α-Maus-IgG Antikörper nachgewiesen. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

3.5 Aufreinigung der Antikörperformate und TR-Fusionsproteine

Nach der Expression der Antikörperfragmente und Fusionsproteine wurden diese mit Hilfe von ProteinL- bzw. ProteinA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die ProteinL-Affinitätschromatographie wurde zur Aufreinigung der scFv und scFv-RNase-Konstrukte eingesetzt. Alle übrigen Antikörper und Fusionsproteine wurden über ProteinA-Affinitätschromatographie gereinigt, da sie über eine Fc-Domäne verfügen. ProteinA zeichnet sich gegenüber ProteinL durch eine deutlich höhere Affinität und Bindungskapazität aus. Nach der Beladung der Säule wurden die Proteine über einen pH Shift von pH 7 nach pH 2,6 eluiert. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen mit Tris/HCl pH 9,0 sofort neutralisiert und die einzelnen Fraktionen im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen auf ihre Reinheit und Konzentration an aufgereinigtem Protein überprüft. Die apparenten Banden der aufgereinigten Konstrukte betrugen für scFv ~25 kDa, IgG 50 kDa und 25 kDa, scFv-Fc 50kDa, scFv-RNase 40 kDa, scFv-RNase-Fc 75 kDa und scFv-Fc-RNase 75 kDa (Abb. 3.6). Nach-folgend wurden die Elutionsfraktionen gepoolt und gegen PBS dialysiert. Die IgG-, scFv-RNase- und scFv-RNase-Fc-Konstrukte, bei denen eine weitere Verunreinigung bestand, wurden mittels präparativer Gelfiltration gereinigt. Trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus ließen sich alle Antikörperformate und Fusionsproteine gut produzieren. Die Ausbeuten bei der transienten Expression in HEK293T Zellen variierten dabei zwischen 2,3 und 4 mg/L. Bei der Expression des α CD30scFv-Fragments in *P.pastoris* wurde eine Ausbeute von bis zu 12 mg/L erreicht.

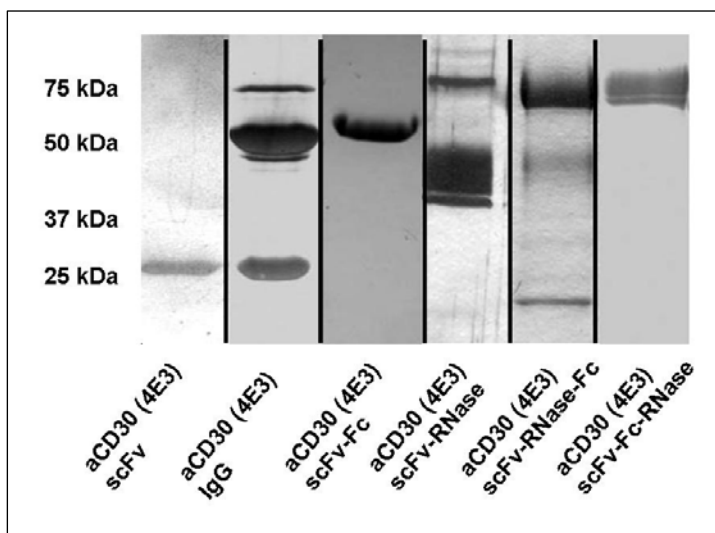


Abb. 3.6: SDS-PAGE der exprimierten und aufgereinigten Antikörper und TR-Konstrukte. (12%, Silberfärbung) Von links nach rechts scFv, IgG, scFv-Fc, scFv-RNase, scFv-RNase-Fc und scFv-Fc-RNase. Die molaren Massen der entsprechenden Banden betragen für das scFv-Fragment ~25 kDa, für den IgG mit seiner schweren und leichten Kette 50 kDa bzw. 25 kDa (Verunreinigung bei 75 kDa), für das scFv-Fc Konstrukt 50 kDa, für die scFv-RNase ~ 40 kDa (Verunreinigung bei 75 kDa) und für die scFv-RNase-Fc bzw. scFv-Fc-RNase jeweils 75 kDa mit teilweisen Abbaubanden bei 50 kDa und unter 25 kDa.

3.6 Kontrolle der aufgereinigten Antikörperformate und TR-Fusionsproteine

Für den Nachweis, dass es sich bei den aufgereinigten Proteinen (Abb. 3.6) trotz bereits identifizierter molarer Massen, um die Antikörper- bzw. Fusionsproteine handelte, wurde zusätzlich ein Westernblot mit Immunofärbung durchgeführt (Abb. 3.7). Der spezifische Nachweis erfolgte im Fall der TR-Konstrukte über die fusionierte humane pankreatische RNase mittels polyklonalem Serum aus Kaninchen, welches durch Immunisierung mit einem RNase A-Peptid (Aminosäure 87 bis 102) generiert wurde, in Kombination mit monoklonalem AP-gekoppelten α -Kaninchen-(γ -spezifisch)-Antikörper. Alternativ wurde der Nachweis über die humane Fc-Region mit murinen α -human-IgG-(Fc spezifisch)-Antikörper bzw. im Fall des α CD30 scFv über α -(His)₅-Antikörper, gefolgt von AP-gekoppelter α -Maus-(Fc spezifisch)-Antikörper geführt. Exemplarisch sind in Abb. 3.7 die detektierten Banden von α CD30 scFv-Fc-RNase bei 75 kDa abgebildet, bei denen der Nachweis sowohl über die Fc-Domäne als auch über die RNase erfolgte. Zusätzlich ist die Detektion von α CD30-scFv-RNase gezeigt, dessen molare Masse bei rund 40 kDa bestätigt werden konnte, wobei multiple Banden nachgewiesen wurden. Generell bestätigte der spezifische Nachweis für alle Antikörperformate und TR-Fusionskonstrukte die in Kap. 3.5 erhaltenen Informationen über die molaren Massen der Moleküle.

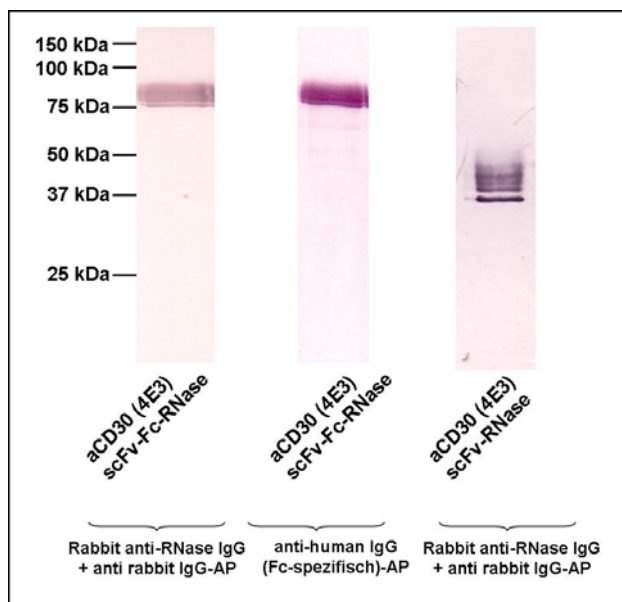


Abb. 3.7: Immunoblot nach Aufreinigung von α CD30scFv-Fc-RNase und scFv-RNase. Immunoblot der gepoolten Elutionsfraktion der affinitätschromatographisch aufgereinigten scFv-Fc-RNase und der scFv-RNase. Die Detektion erfolgte dabei über ein RNase-spezifisches Kaninchenserum in Kombination mit einem AP-konjugierten murinen α -Kaninchen-IgG Antikörper bzw. direkt über AP-gekoppelten murinen- α -human-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper.

3.7 Charakterisierung der Antikörperformate und TR-Fusionsproteine

Die CD30-spezifischen Antikörperformate und die daraus abgeleiteten TR-Fusionskonstrukte wurden bei der nachfolgenden Charakterisierung die Bindungseigenschaften, die mögliche Aggregatbildung und die RNase-Aktivität der TR untersucht. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über den Aufbau des TR-Konstrukts geben, das am besten für das *Targeted RNase*-Konzept geeignet ist.

3.7.1 Gelfiltration

Zur weiteren Charakterisierung der in *P.pastoris* und HEK293T Zellen produzierten TRs wurde unter Verwendung einer Superdex 200 Säule eine Gelfiltrationschromatographie im analytischen bzw. präparativen Maßstab vollzogen. Für eine exakte Bestimmung der molaren Massen der zu analysierenden Fusionsmoleküle wurde zuvor eine Kalibrierung beider Säulen mit den Referenzproteinen Chymotrypsin, Ovalbumin, Albumin und Immunglobulin (25 kDa, 43 kDa, 67 kDa und 150 kDa) durchgeführt. Stellvertretend dargestellt sind in Abb. 3.9 die präparative Gelfiltration des in *P.pastoris* produzierten scFv-Fragments und in Abb. 3.10 die analytische Gelfiltration des scFv-Fc-RNase-Konstrukts. Es zeigte sich in keinem der Gelfiltrationsläufe eine Aggregatbildung der Antikörperfusionsmoleküle. Die scFv-RNase-Konstrukte erwiesen sich mit einer molaren Masse von 40 kDa, ebenso wie die scFv-Fc-RNase- bzw. scFv-RNase-Fc-Fusionsproteine mit einer Masse von ca. 150 kDa, als Monomere.

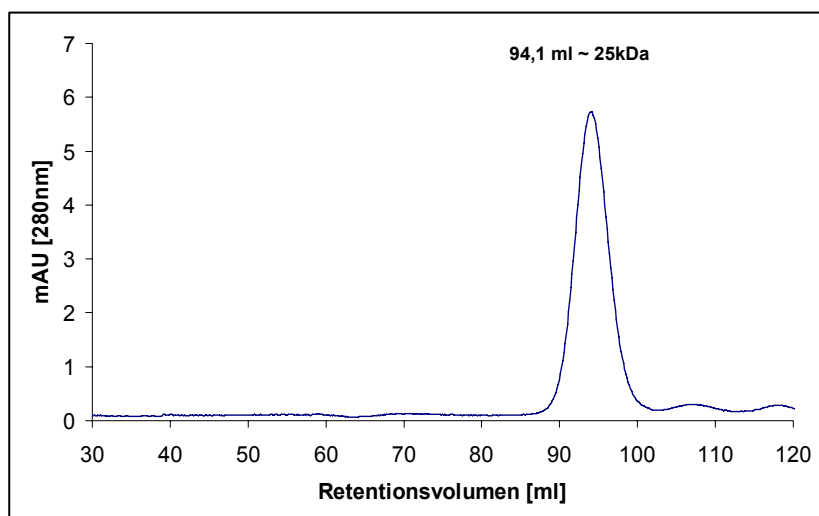


Abb. 3.9: Präparative Gelfiltration von ProteinL-gereinigtem scFv-Fragment (600 µg/mL). Der Lauf erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule (HiLoad 16/60). Das injizierte Probenvolumen betrug 500 µL. Der Elutionspeak betrug 94,1 mL. Dies entspricht einer molaren Masse von ~25 kDa.

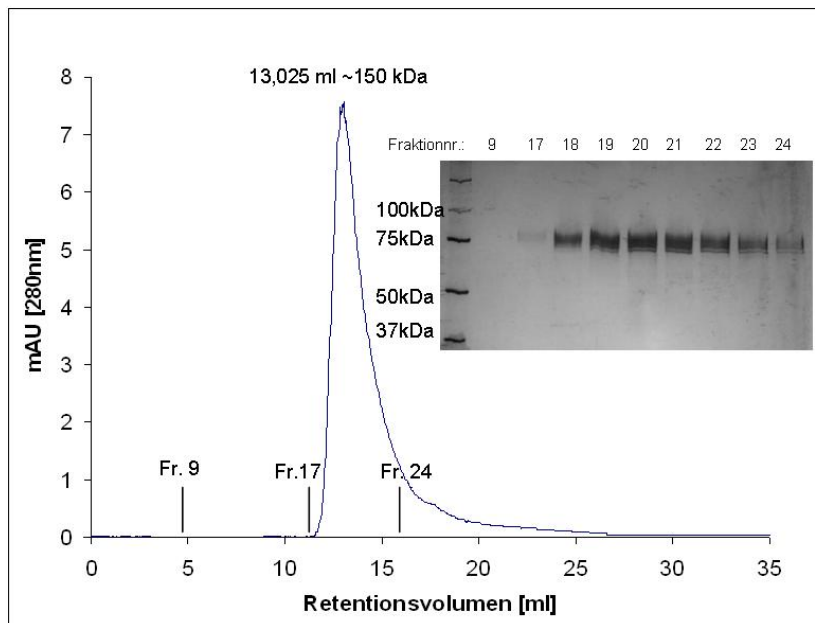


Abb. 3.10: Analytische Gelfiltration von ProteinA gereinigter scFv-Fc-RNase (160 µg/mL). Der Lauf wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule (10/300 GL) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 500 µL. Der Elutionspeak betrug 13,03 mL. Dies entspricht einer molaren Masse von 150 kDa. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels reduzierender SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetragen. Die MW des Elutionspeaks betrug 75 kDa.

3.7.2 Bestimmung der Affinität (K_D), k_{on} - und k_{off} -Raten mittels „Surface Plasmon Resonance“

Zur Bestimmung der Affinität (Dissoziationskonstante K_D) bzw. der Assoziationsrate (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off}) wurde das Verfahren der Oberflächenplasmonresonanz (SPR; *surface plasmon resonance*) mit einem BIAcore2000 Gerät angewendet. Um die Wechselwirkung der verschiedenen Antikörperformate bzw. TR-Fusionsproteine mit dem Antigen CD30 zu untersuchen, wurde das rekombinant hergestellte CD30-Fc-Fusionsprotein (Kap. 3.2) als Ligand an der Chip-oberfläche kovalent gebunden. Für jedes Antikörperformat und TR-Konstrukt wurden BIAcore-Messungen mit mehreren Konzentrationen durchgeführt, wobei mindestens eine Doppelmessung zur Reproduzierbarkeit des Signals erfolgte. Anhand der aufgenommenen Daten und der daraus abgeleiteten Overlayplots (Abb. 3.11) ließen sich mit Hilfe der Evaluationssoftware „BIAevaluation 3.2“ die Geschwindigkeitsraten und Affinitäten berechnen (Tab. 3.1).

Antikörperfragment bzw. <i>Targeted RNase</i>	K_D [M]	K_A [1/M]	k_d [1/s]	k_a [1/Ms]
α CD30(4E3)-scFv (steady-state)	5,66E-07	1,77E+06	-	-
α CD30(4E3)-scFv-RNase (steady-state)	4,32E-07	1,53E+06	-	-
α CD30(4E3) IgG	1,68E-08	5,95E+07	168	-
α CD30(4E3)-scFv-RNase-Fc	7,43E-10	1,35E+09	4,30E-03	5,78E+06
α CD30(4E3)-scFv-Fc	6,70E-9	1,49E+08	1,40E-02	2,09E+06
α CD30(4E3)-scFv-Fc-RNase	9,81E-10	1,02E+09	5,64E-03	5,76E+06

Tab. 3.1: Übersicht der ermittelten Affinitäten (K_D), Assoziationsraten (k_{on}) und Dissoziationsraten (k_{off}) der Antikörperformate und TR. Die Affinitäten liegen im Bereich von 600 nM (scFv) bis kleiner 1 nM (scFv-Fc-RNase). Die Geschwindigkeitsraten für die scFv bzw. scFv-RNase ließen sich nicht bestimmen. Die Analyse erfolgte über die Gleichgewichtseinstellungen in den Messungen.

Dabei war es aufgrund der hohen k_{on} - und k_{off} -Raten für das monovalente scFv-Antikörperfragment notwendig, eine Bestimmung der Werte unter Gleichgewichtseinstellung durchzuführen. Bei den bivalenten IgG- und scFv-Fc Formaten war eine Ermittlung der Konstanten über den eigentlichen Bereich der Assoziation bzw. Dissoziation möglich.

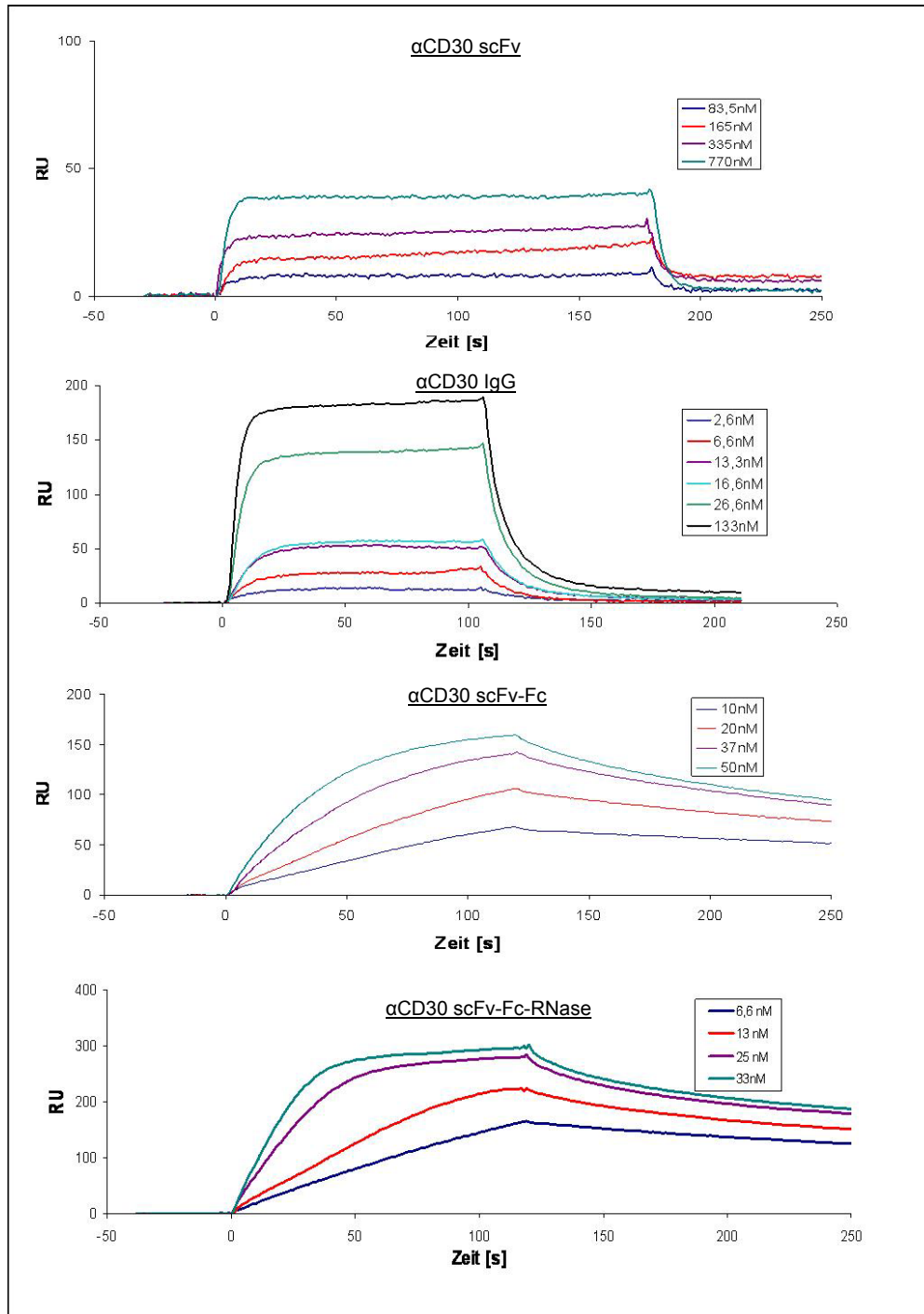


Abb. 3.11: Overlay-Plots der am BIAcore 2000 gemessenen Sensogramme der verschiedenen CD30 spezifischen Antikörperformate und TR-Konstrukte. Die Overlay-Plots der gemessenen Sensogramme wurden anhand verschiedener Konzentrationen (von oben nach unten) an α CD30scFv, α CD30-IgG, scFv-Fc und scFv-Fc-RNase ermittelt. Für die Messungen wurde ein CM5-Chip eingesetzt, auf dem das in Kap. 3.2 erzeugte Antigen CD30-Fc kovalent und für die Negativkontrolle Lysozym gekoppelt wurde. Die Doppelbestimmung ist in den Overlay-Plots nicht abgebildet.

3.7.3 Nachweis der Erkennung von nativen CD30 auf Lymphomzelllinien mittels Durchflusszytometrie-Messung

Für die Evaluierung der Antigenbindung, der CD30-spezifischen Antikörperkonstrukte an natives CD30, wurde in der Durchflusszytometrie, unter Verwendung eines Cytomics FC500 von Beckmann Coulter, die CD30 positive Karpas-299 Zelllinie eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden HD-MY-Z-Zellen eingesetzt, die kein CD30 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im ersten Schritt wurden die beiden Zelllinien, von denen pro Ansatz 10^6 Zellen eingesetzt wurden, mit dem jeweiligen Antikörperkonstrukt inkubiert. Hierzu wurden in einem Vorversuch das scFv-Fragment, IgG- und scFv-RNase-Fc-Formate untersucht, um das optimale Antikörperformat zu bestimmen. Der direkte Vergleich der Antikörperformate wurde in Kooperation mit Prof. Dürkop, Charité Berlin, durchgeführt, da für die schwache Bindung des scFv und des IgG ein etablierter Nachweis über PE existierte. Die Detektion erfolgte über einen murinen α -humanen-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper, bzw. beim scFv über einen murinen α -(His)₅-Antikörper, in Kombination mit einem PE-markierten α -Maus IgG Antikörper vom Kaninchen. (Abb. 3.12).

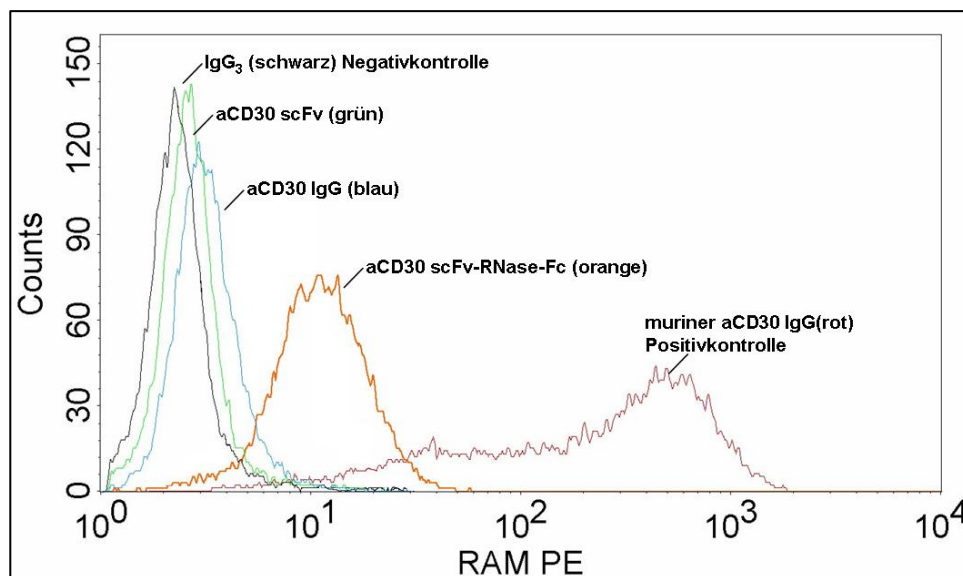


Abb. 3.12: Durchflusszytometrische Messung zur Ermittlung der Bindungseigenschaften der verschiedenen Antikörperformate und TR-Konstrukte. CD30⁺ Karpas Zellen (pro Färbung 10^6 Zellen) wurden mit den aufgereinigten α CD30-scFv, α CD30 IgG (pro Ansatz 0,2 μ g/ μ L) und scFv-RNase-Fc (0,01 μ g/ μ L) inkubiert und gebundene Moleküle wurden über murinen α -humanen IgG (Fc-spezifisch) Antikörper, bzw. beim scFv über murinen α -(His)₅-Antikörper, in Kombination mit einem PE-markierten α -Maus-IgG-Antikörper (aus Kaninchen) in der Durchflusszytometrie detektiert. Als Negativkontrolle diente ein humaner IgG₃-Antikörper. Ein muriner CD30-spezifischer Antikörper (BerH2) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Für den nachfolgenden Vergleich der bivalenten scFv-Antikörper mit den RNase Fusionsvarianten wurde ein FITC-konjugierter muriner α -human-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper als Detektionsantikörper eingesetzt (Abb. 3.13).

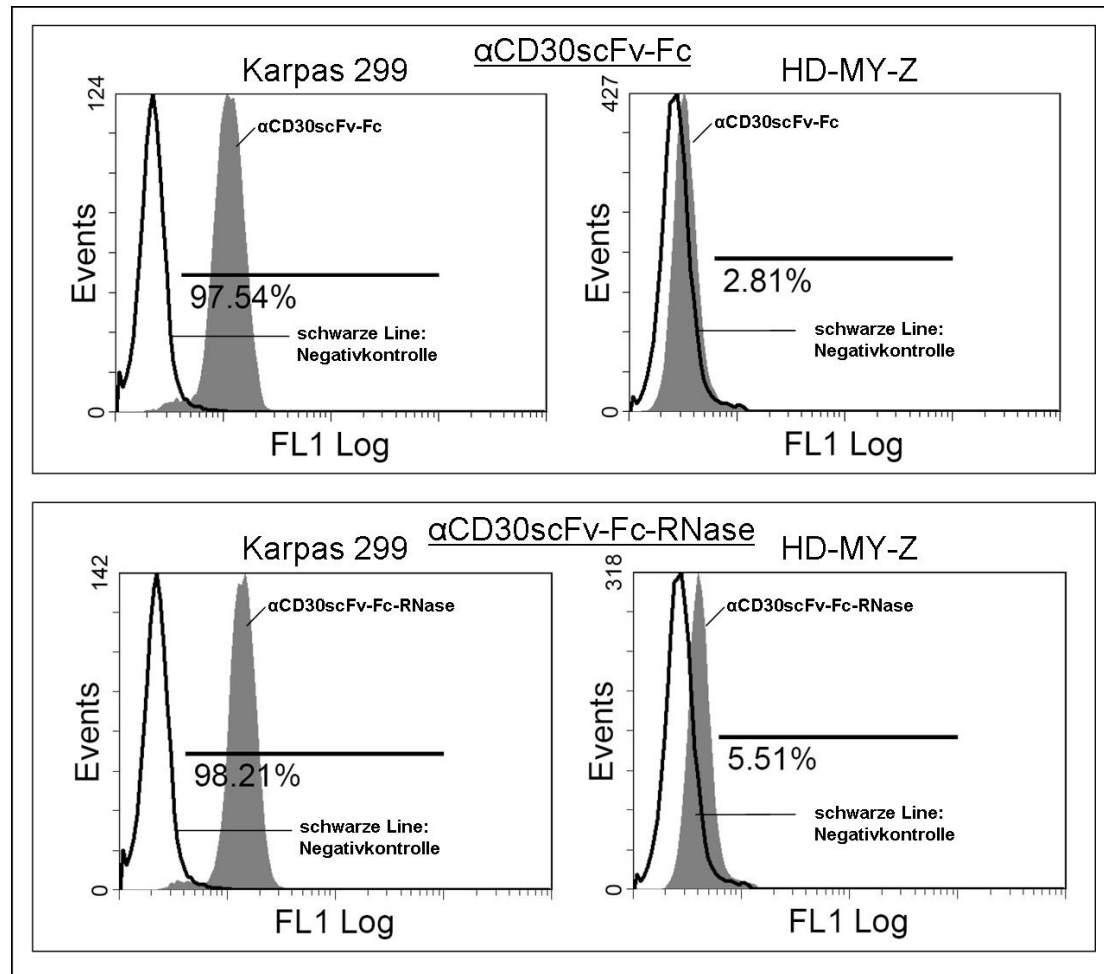


Abb. 3.13: Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Bindungseigenschaften von $\alpha\text{CD30scFv-Fc}$ und $\alpha\text{CD30scFv-Fc-RNase}$ an natives CD30. CD30⁺ Karpas-Zellen (linke Histogramme) bzw. CD30⁻ HD-MY-Z-Zellen (rechte Histogramme) (pro Färbung 10^6 Zellen) wurden mit dem aufgereinigten $\alpha\text{CD30scFv-Fc}$ -Antikörper (obere Histogramme) und der *Targeted RNase* (untere Histogramme) (pro Ansatz 1 μg) inkubiert. Gebundene Moleküle wurden über FITC-gekoppelte murine α -humane-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper in der Durchflusszytometrie detektiert. Ein Mucin1 spezifischer humaner IgG₁ wurde als Negativkontrolle (schwarze Linie) eingesetzt.

Eine spezifische Bindung an CD30 konnte für die scFv-Fc, scFv-RNase-Fc und scFv-Fc-RNase-Konstrukte (je 1 μg) nachgewiesen werden (Abb. 3.12 und 3.13). Das IgG-Format und das scFv-Format zeigten im Vergleich zum bivalenten scFv-Fc-Format erst bei wesentlich höheren Konzentrationen (> 20 μg) eine Bindung (Abb. 3.12). In der weiteren Analyse zeigten bei den scFv-Fc-Antikörpern, unabhängig von der RNase-Fusion, mindestens 97% der CD30-exprimierenden Karpas-299 Zellen ein positives Fluoreszenzsignal (Abb. 3.13). Für die RNase-Fusionen mit scFv-Fc war auch eine geringfügig erhöhte Bindung an CD30 negative HD-MY-Z Zellen detektierbar (Abb. 3.13).

3.7.4 In vitro RNase-Aktivität

Ein essentieller Bestandteil der *Targeted RNase*-Konstrukte ist die funktionelle Aktivität der fusionierten RNase als zytotoxisches Enzym, welches den zellulären Translationsapparat hemmt. Zur Messung der *in vitro*-Aktivität der RNase-Fusionsproteine wurde die Inhibition der *in vitro* Translation von Luziferase-mRNA gemessen. Nach erfolgter *in vitro* Translationsreaktion wurde die Luziferaseaktivität bei 562 nm gemessen, wobei die Luziferaseaktivität der Translationsansätze in Triplikaten ermittelt wurde (Abb. 3.14).

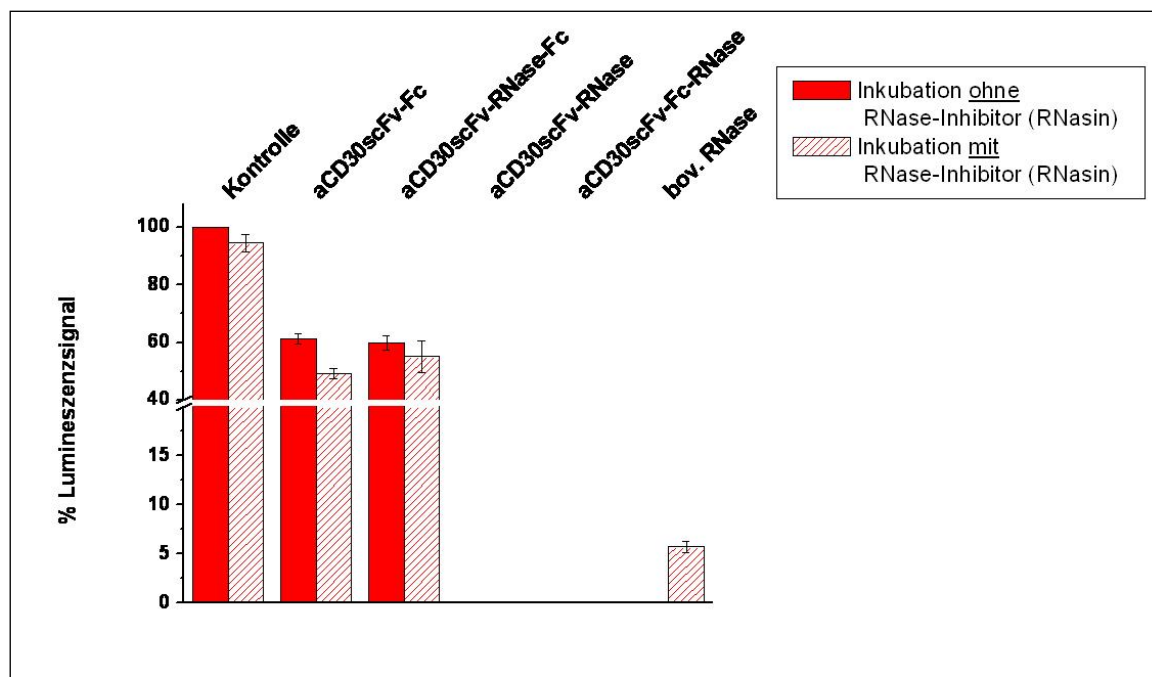


Abb. 3.14: Bestimmung der RNase-Aktivität durch *in vitro*-Translation von Luciferase-mRNA und Messung des Lumineszenzsignals. Bovine RNase A (2,5 µM) wurde als Positivkontrolle für die RNase-Aktivität eingesetzt, während RNase-freies PBS als Negativkontrolle diente. scFv-RNase, scFv-Fc, scFv-RNase-Fc und scFv-Fc-RNase wurden mit gleicher Molarität eingesetzt. In einer vergleichenden RNase-Aktivitätsmessung wurde der RNase-Inhibitor RNasin (Promega) zugesetzt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Ein geringeres Lumineszenzsignal korreliert mit zunehmender RNase-Aktivität.

Bovine RNase diente als Positivkontrolle und RNase-freies PBS als Negativkontrolle der Messung der RNase-Aktivität. Für die *in vitro* Bestimmung der RNase Aktivität wurden die RNase-Fusionskonstrukte und die bovine RNase in äquimolaren Mengen eingesetzt (2,5 µM). Es konnte kein Unterschied in der RNase-Aktivität der αCD30-scFv-RNase und der αCD30-scFv-Fc-RNase bei der eingesetzten Konzentration festgestellt werden. In beiden Fällen war die Translation der Luziferase-mRNA komplett inhibiert worden, so dass keine Luziferase-Aktivität gemessen wurde. Dieses Ergebnis ist identisch mit der Positivkontrolle (bovine RNase). Die Fusion der humanen RNase zwischen dem scFv-Fragment und der Fc-

Domäne des scFv-Fc-Konstruktes (scFv-RNase-Fc) zeigte keine RNase-Aktivität, die über der RNase-Aktivität der scFv-Fc Kontrolle lag.

Die Präsenz von RNase-Inhibitor (RI) Molekülen im Zytoplasma setzt voraus, dass die TR nicht sensitiv gegenüber der hochaffinen Bindung des RI (ca. 10^{-14}M) ist. Dazu wurde in parallelen Ansätzen die RNase-Aktivität in Gegenwart des RNase-Inhibitors RNasin bestimmt. Hierbei zeigte sich die Fusion der humanen pankreatischen RNase an den C-terminus des $\alpha\text{CD30-scFv-Fc}$ Antikörpers bzw. des $\alpha\text{CD30-scFv}$ -Fragments im Vergleich zur bovinen RNase A als weniger sensitiv gegenüber RNase-Inhibitor.

3.7.5 CD30-rezeptorvermittelte Endozytose von Targeted RNase

Nachdem die RNase-Aktivität und die Bindung an natives CD30 für das $\alpha\text{CD30-scFv-Fc-RNase}$ -Konstrukt belegt wurden und sich dieses Format in seinen Eigenschaften den anderen Formaten als überlegen erwies (Kap. 4.1), musste die Internalisierung in CD30^+ Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden wiederum die Zelllinien Karpas-299 und HD-MY-Z verwendet, die für die Dauer von 4 Stunden bei 37°C mit $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ $\alpha\text{CD30-scFv-Fc-RNase}$ inkubiert wurden. Gleichzeitig wurden Kontrollansätze bei 4°C inkubiert, da bei dieser verringerten Temperatur nahezu keine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt (Lee *et al.* 2001).

Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die TR-Moleküle wurden über FITC-markierte murine α -humane-IgG-Antikörper detektiert und eine Co-Färbung des Nucleus wurde mit DAPI durchgeführt. Für den Nachweis des als Positivkontrolle verwendeten murinen $\alpha\text{CD30-IgG}$ wurde ein FITC-konjugierter α -Maus-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper (aus Ziege) verwendet. Im eingesetzten konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurde das emittierte Licht über zwei Breitbandfilter von $385\text{ nm} - 470\text{ nm}$ für DAPI und $505\text{ nm} - 550\text{ nm}$ für FITC detektiert. Bei der Verteilung der TR-Moleküle zeichnete sich ein deutlicher Unterschied zwischen 37°C und 4°C ab. Während bei 4°C ausschließlich eine Korona um die Zellmembran sichtbar war, so dass die TR-Moleküle sich ausschließlich auf der Oberfläche der Zellmembran befanden, zeigte sich nach Inkubation bei 37°C eine für rezeptorvermittelte Endozytose charakteristische punktuelle Verteilung (Abb. 3.15). Die gleichen Verteilungsmuster lassen sich auch bei der positiven Kontrolle mit dem murinen $\alpha\text{CD30-IgG}$ feststellen, in der sich nach der 37°C -Inkubation eine noch stärkere intrazelluläre Lokalisation des Antikörpers nachweisen lässt.

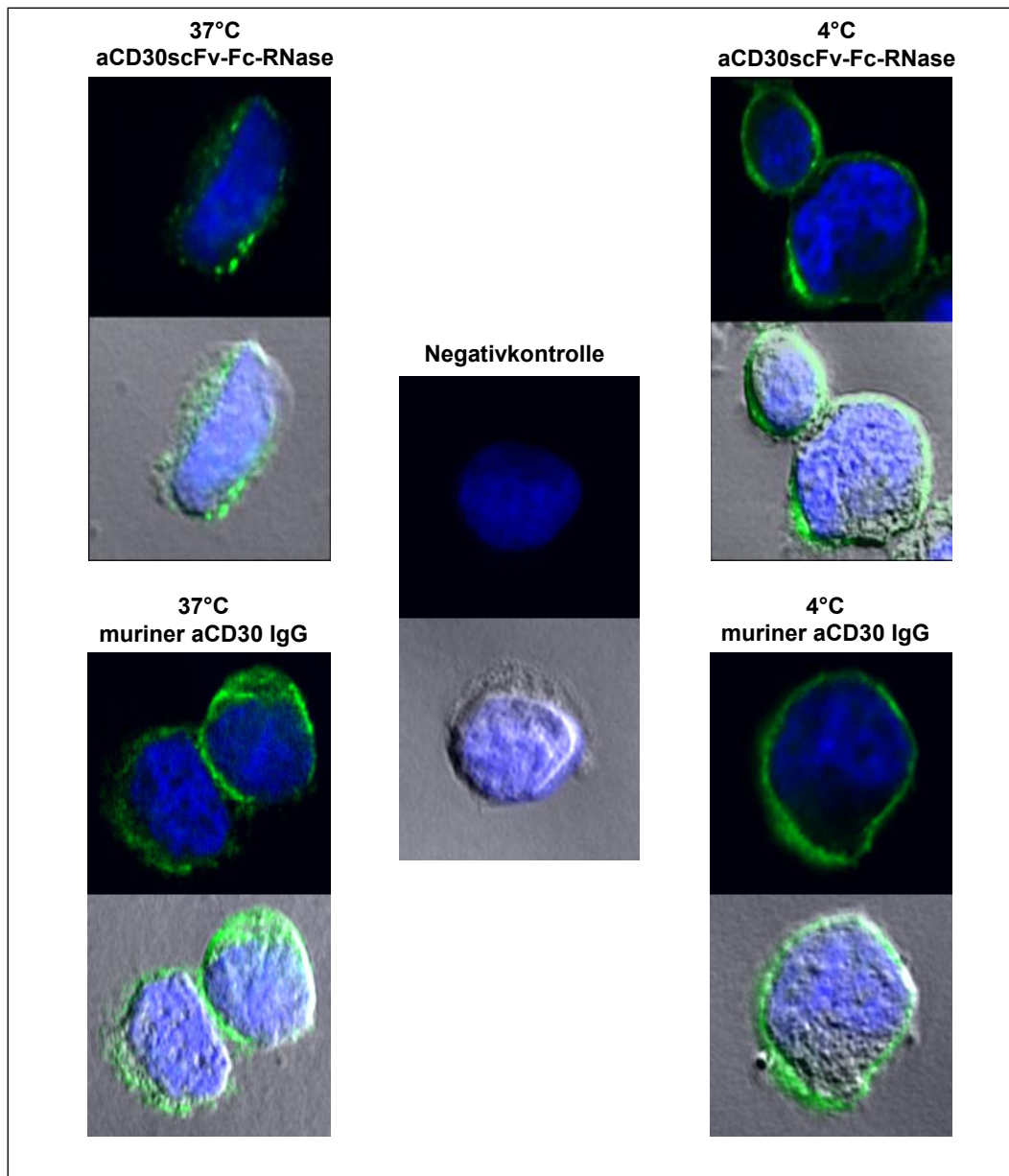


Abb. 3.15: Rezeptorvermittelte Internalisierung der *Targeted RNase* (αCD30-scFv-Fc-RNase) von CD30⁺ Karpas-Zellen. Die Zellen wurden für 4 h mit 25 µg/mL *Targeted RNase* bei 4°C bzw. 37°C inkubiert. Die TR-Moleküle wurden über FITC-markierte murine α-humane-IgG-Antikörper detektiert (grün). Eine Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Bei 37°C ist die Internalisierung detektierbar, wohingegen bei 4°C nur eine Lokalisation der TRs an der Oberfläche vorliegt. Das gleiche Verteilungsmuster zeigte sich bei der murinen αCD30-IgG Positivkontrolle. Sämtliche Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen. Die jeweils obere Aufnahme eines Bildes zeigt die Co-Färbung und die untere die identische Aufnahme bei Durchlichtmikroskopie.

3.7.6 Targeted RNase vermittelte Proliferationsinhibition von CD30⁺ Lymphomen

Um die Funktion des erzeugten TR-Konstrukts entsprechend dem *Targeted RNase*-Konzept zu verifizieren, wurde nach der abgeschlossenen proteinbiochemischen Charakterisierung der α CD30-scFv-Fc-RNase, der Einfluss der TRs auf die Viabilität der CD30⁺ Lymphomzelllinie Karpas 299 untersucht. Hierzu wurden 1×10^4 Zellen (Karpas 299 bzw. HD-MY-Z) bei verschiedenen Konzentrationen (0-100 nM) an TR bzw. α CD30-scFv-Fc für 72 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Gesamtzellzahl an lebenden Zellen bestimmt und mit der eingesetzten Antikörper- bzw. TR-Konzentration korreliert (Abb. 3.16). Deutlich erkennbar ist die starke, TR-konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation der Karpas 299 Zelllinie. Mit sinkender TR-Konzentration steigt die Gesamtzellzahl auf bis zu 9×10^4 Zellen an. Bei Konzentrationen über 60 nM TR verbleibt die Gesamtzellzahl auf ihrem Ausgangsniveau von ca. 10^4 Zellen, während CD30 negative Zellen in Gegenwart von TR weiterhin proliferieren und eine Gesamtzellzahl zwischen 7×10^4 bis 9×10^4 erreichten. Die Proliferation der beiden Zelllinien wird nicht durch α CD30-scFv-Fc beeinträchtigt. Die Werte für die Gesamtzellzahl lagen in diesen Fällen zwischen 7×10^4 und 9×10^4 Zellen. Die ermittelte inhibitorische Konzentration (IC_{50}) liegt bei 3,3 nM. Jedem Messpunkt des Diagramms liegt ein Triplikat des Versuchsansatzes zugrunde.

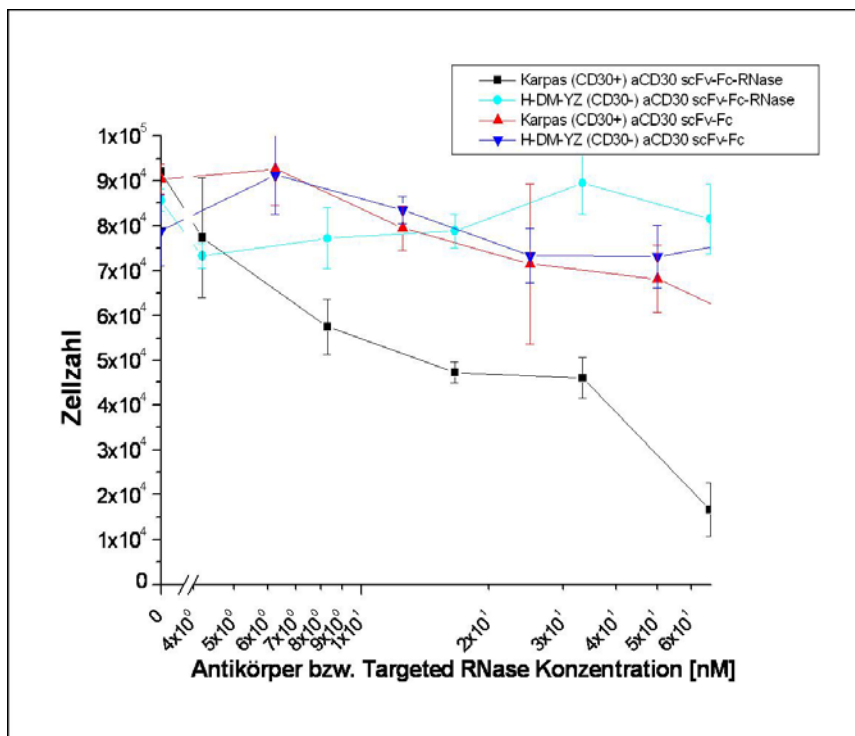


Abb. 3.16: Inhibition der Proliferation von CD30 positiven Karpas Zellen. Die TRs wirken sich mit einer IC_{50} von 3,3 nM stark inhibierend auf die Proliferation der Karpas Zellen aus (schwarze Linie), während die Proliferation der CD30⁻ HD-MY-Z-Zellen nicht von TR beeinflusst werden (hellblaue Linie). Die entsprechenden Kontrollen mit α CD30-scFv-Fc ohne RNase-Fusion zeigen minimale bis keine Auswirkung auf die Proliferation der Zelllinien (rot und dunkelblaue Linie).

3.7.7 Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität als weitere Effektorfunktion

Als unterstützender Faktor, der zur Apoptose CD30-positiver Lymphome beitragen könnte, wurde die Fähigkeit der α CD30-scFv-Fc-RNase zur Induktion einer antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) untersucht. Die benötigten Effektorzellen (PBMCs, u.a. NK-Zellen) wurden isoliert und mit 30 U/mL humanem IL-2, das insbesondere NK-Zellen aktiviert, über einen Zeitraum von 5 Tagen stimuliert. Entsprechende Kontrollen für eine antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität (AICC; *antibody independent cellular cytotoxicity*) und einer CD30-Antigen-unabhängigen Zytotoxizität wurden parallel bestimmt (Abb. 3.17). Zum Vergleich wurde als weitere Kontrolle für die Bewertung des Einflusses der RNase Fusion der scFv-Fc Antikörper auf seine Fähigkeit untersucht, ADCC zu vermitteln. Zur Messung der durch Apoptose freigesetzten zytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH) diente ein colorimetrischer Farbumschlag, der von LDH in Verbindung mit NADH^+ durch die Reduktion von Tetrazoliumsalz katalysiert wird. Bei der Bestimmung der Zytotoxizität wurden im Versuchsansatzs jeweils Triplikate durchgeführt und bei 492nm vermessen.

Die Auswertung der ADCC-Untersuchung zeigt, dass für das scFv-Fc-RNase-Konstrukt keine zelluläre Zytotoxizität nachweisbar ist. Bei dem α CD30-scFv-Fc hingegen lag die antikörperversmittelte zelluläre Zytotoxizität vor. Für die CD30 positiven Karpas 299 Zellen zeigte sich in Abhängigkeit von einem steigenden Effektor- zu Targetzellen (E/T) Verhältnis eine zunehmende Zytotoxizität. Die für Karpas 299 Zellen gemessenen ADCC reichte dabei von 6% bis 49%. In wiederholten Versuchen zeigten sich Zytotoxizitäten bis zu 80%. Dieser Effekt war nicht nachweisbar in den Ansätzen zur Bestimmung der AICC. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Messung der ADCC auf CD30 negativen HD-MY-Z Zellen, für die weder eine Abhängigkeit der ADCC vom E/T-Verhältnis noch eine hohe Zytotoxizität nachweisbar war. Die Zytotoxizität für die HD-MY-Z Zellen lag, mit Ausnahme beim E/T Verhältnis von 100, unter 4%.

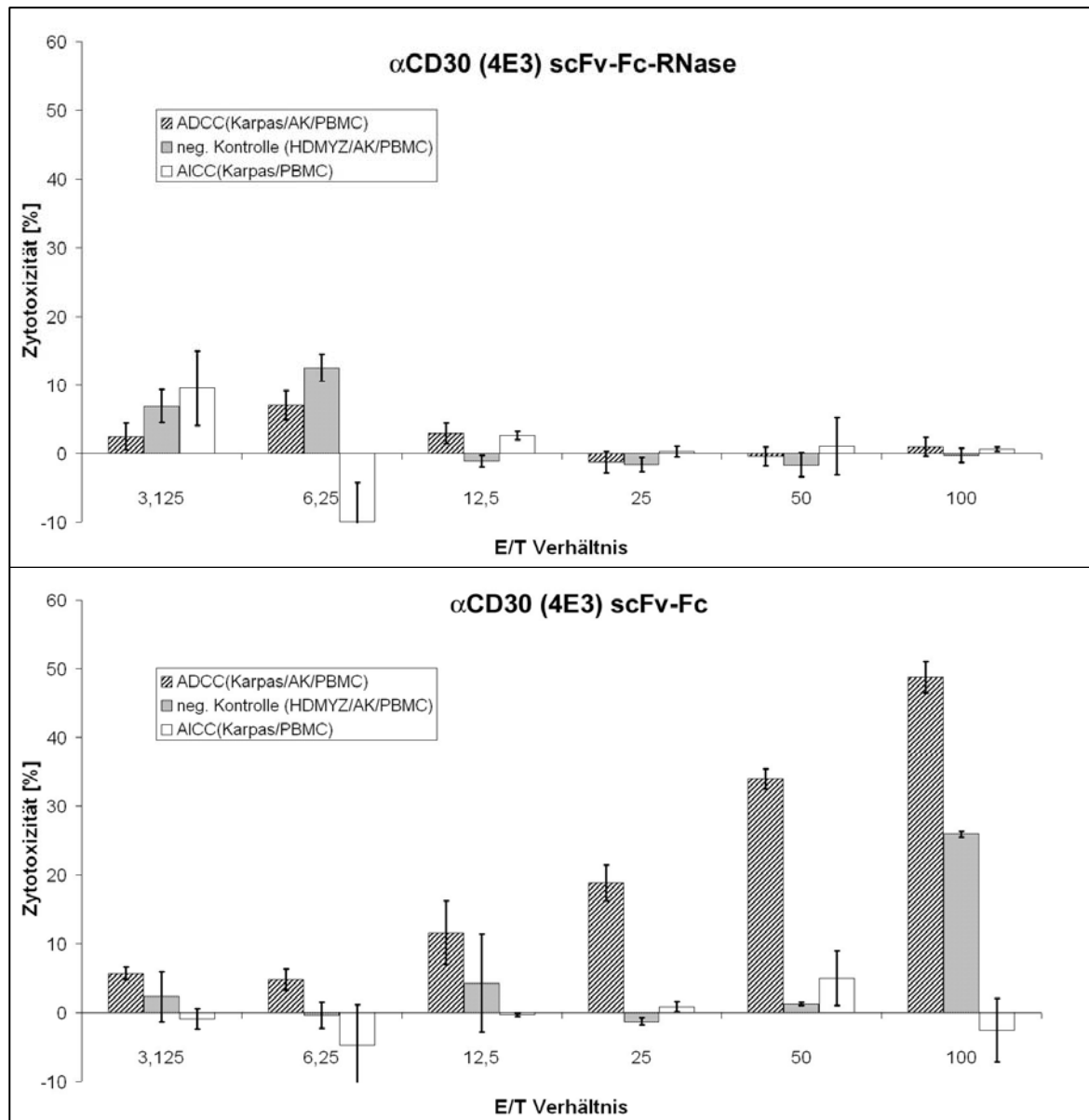


Abb. 3.17: Bestimmung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität vermittelt von αCD30(4E3)scFv-Fc-RNase und αCD30(4E3)scFv-Fc. Die eingesetzten PBMCs (5×10^6 /mL) wurden für 5 Tage mit 30 U/mL IL-2 stimuliert. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte in Triplikaten mit einer Inkubationsdauer von 4 h und einer Variation des Effektor- zu Zielzellen Verhältnis von 3 bis 100. Die Daten stellen die mittlere prozentuale Zytotoxizität der Triplikatmessungen einschließlich der Standardabweichung dar. Als Kontrollen wurde die CD30-negative Zelllinie HD-MY-Z und die antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität bei den Messungen eingeschlossen.

3.8 Design neuer Antikörperperformate für TR-Fusionen

Aufgrund der zahlreichen Studien, die zu dem murinen Hühnereiweiß-Lysozym spezifischen Antikörper D1.3 existieren, wurde dieser Modellantikörper bei dem Design neuer Antikörperperformate genutzt (Ward 1995). Es wurden zwei neuartige Antikörperperformate bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette bzw. zwei Einzelketten, die über intermolekulare Disulfidbrücken kovalent zu Homodimeren verknüpft, auf ihre Produzierbarkeit und Funktionalität untersucht. Sie werden nachfolgend scFabΔC (*single*

chain Fab Δ C) und scIgG (*single chain* IgG) abgekürzt. Ihren schematischen Aufbau zeigt Abb. 3.18. Die Deletion von Cystein 213 in der C_L Domäne und Cystein 464 in der C_{H1} Domäne des scFab-Formats erwiesen sich als vorteilhaft in der prokaryotischen Produktion und der Funktionalität (basierend auf unveröffentlichten Daten von Dr. Hust).

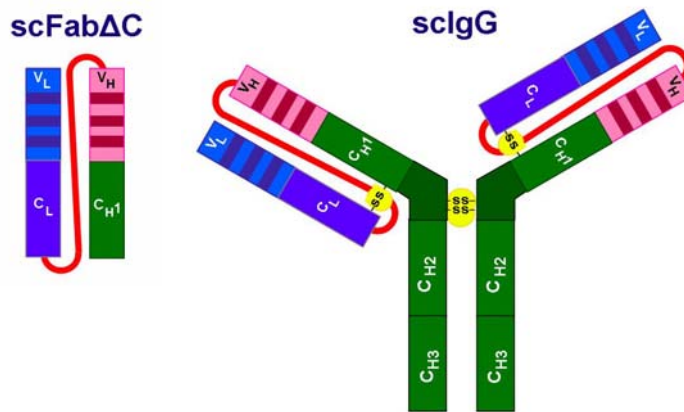


Abb. 3.18: Schematischer Aufbau von D1.3-scFab Δ C und D1.3-sclgG. Der scFab Δ C besteht aus einer Polypeptidkette, indem der Anteil der schweren Kette (V_H-C_{H1}) über einen Glycin-Serin-Peptid Linker an den C-Terminus der leichten Kette fusioniert ist. Für den sclgG ist die Fusion der leichten und schweren Kette identisch, mit der Ausnahme, dass eine komplette schwere Kette mit hinge und Fc-Region an V_L-C_L fusioniert ist. In beiden Formaten sind weiterhin die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen schwerer und leichter Kette vorhanden.

3.8.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung des D1.3-scFab Δ C

Für die Klonierung des D1.3-scFab Δ C wurde, ausgehend von einem existierenden D1.3-Fab-Expressionsvektor, die kodierende Gensequenz der leichten Kette V_L-C_L (kappa) am 3'-Ende über ein 34 Aminosäure codierendes Linker-DNA-Segment mit dem 5'-Ende der cDNA von V_H-C_{H1} fusioniert und über generierte Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Xba*I in den Expressionsvektor pPICZalphaA für eine Expression in *P.pastoris* kloniert. Nach erfolgter Transformation in den *P.pastoris*-Stamm KM71 und Selektion eines D1.3scFab Δ C sekretierenden Klons mittels Screening im 96well-Format und Antigen-ELISA, fand die Proteinexpression in einem Kulturvolumen von 250 mL in Schüttelkolben bei 30°C statt. Die Induktion erfolgte nach 24 h durch Medienwechsel zwecks Austausch der Kohlenstoffquelle Glycin durch Methanol. Die Expression wurde für weitere 72 h aufrecht erhalten. Für die Aufreinigung wurde die ProteinL-Affinitätschromatographie eingesetzt, da die murine leichte kappa Kette an ProteinL bindet. Das scFab Δ C-Fragment wurde durch einen pH-Shift von pH 6,0 auf pH 2,6 eluiert und die Elutionsfraktion sofort neutralisiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte im 12% SDS-Gel (Silberfärbung) unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.19). Deutlich sichtbar ist die scFab Δ C-Bande mit einer molaren Masse von 50 kDa. Zusätzlich sind zwei weitere wesentlich schwächere Banden bei 75 kDa und unter 37 kDa vorhanden. Im Anschluss wurde die scFab Δ C-beinhaltende Fraktion (1 mL) gegen PBS dialysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ergab 173 µg/mL, so dass die Ausbeute bei ca. ~700 µg/L liegt. In der weiteren Analyse zeigte sich im

Immunoblot (Abb. 3.19) eine deutliche Bande bei 50 kDa. Für den Nachweis wurde ein AP-gekoppelter α -Maus-(Fab spezifisch)-Antikörper eingesetzt. Zusätzlich ist eine breite, aber wesentlich schwächer gefärbte Proteinbande bei 37 kDa sichtbar.

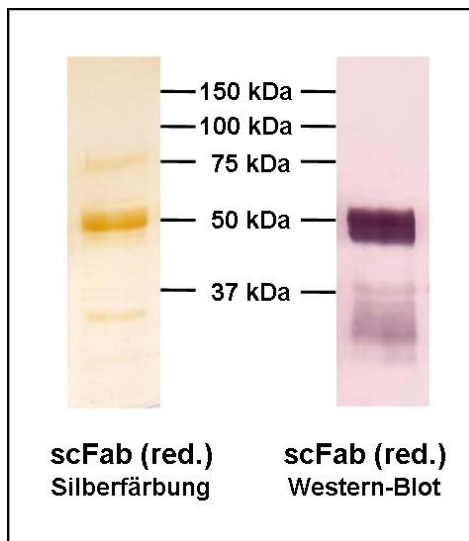


Abb. 3.19: SDS-PAGE und Immunoblot des ProteinL aufgereinigten D1.3-scFab Δ C. D1.3-scFab Δ C wurde aus dem Kultivierungsüberstand von *P.pastoris* über ProteinL-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Elutionsfraktion wurde gepoolt und gegen PBS dialysiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (12%; Silberfärbung). Es zeigten sich drei apparente Banden auf bei 75 kDa, 50 kDa und 25 kDa. Für den Nachweis des scFab Δ C im Immunoblot wurde ein AP-gekoppelter α -Maus-(Fab spezifisch)-Antikörper verwendet.

Die gereinigte Probe an D1.3-scFab Δ C wurde mittels analytischer Gelfiltration auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule untersucht, um die Dimerisierung bzw. Multimerisierung zu ermitteln. Es zeigte sich, dass die in *P.pastoris* produzierten D1.3-scFab Δ C-Fragmente ein sehr heterogenes Spektrum an unterschiedlichen Aggregaten aufweisen. In Abb. 3.20 sind drei Peaks mit den Retentionsvolumina 15,4 mL, 13,4 mL, und zwischen 10,2 mL und 11,5 mL zu erkennen. Die berechneten molaren Massen betragen für die Monomere 54 kDa (15,4 mL), für die Dimere 120 kDa (13,4 mL) und für die Multimere >260 kDa (>10,2 mL).

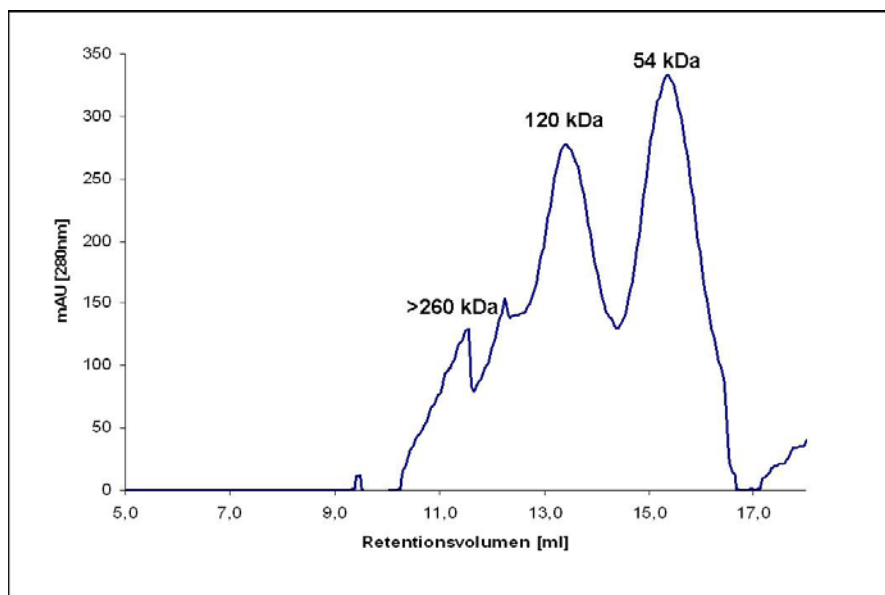


Abb. 3.20: Analytische Gelfiltration des ProteinL gereinigten D1.3-scFab Δ C (1 mg/mL). Der Lauf wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 500 μ L. Die Retentionsvolumina der Elutionspeaks betrugen 15,4 mL (monomerer scFab Δ C; 54 kDa), 13,4 mL (dimerer scFab Δ C; 120 kDa) und weitere 10,2 mL bis 11,5 mL (multimere Aggregate; >260 kDa).

Zur Überprüfung der Funktionalität, d.h. der Antigen-Bindung, wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Aggregate, die in der Gelfiltration isoliert wurden, auf 1 µg/mL eingestellt und im Antigen-ELISA verwendet (Abb. 3.21). Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen reichten dabei von 8 ng/mL bis 1 µg/mL. Die Antigenkonzentration (Lysozym) betrug 1 µg/well. Als Negativkontrolle wurde BSA mit 1 µg/well auf der ELISA-Platte immobilisiert. Für die Detektion von gebundenem D1.3-scFabΔC wurde HRP-gekoppeltes ProteinL verwendet. Die Auswertung des Antigen-ELISA zeigte, dass der scFabΔC als Monomer nicht an Lysozym bindet. Die dimere und multimeren Form des D1.3-scFabΔC hingegen bindet konzentrationsabhängig nahezu im gleichen Ausmaß an Lysozym. Für keine der verschiedenen Aggregationszustände bzw. Konzentrationen wurde eine unspezifische Bindung an BSA detektiert.

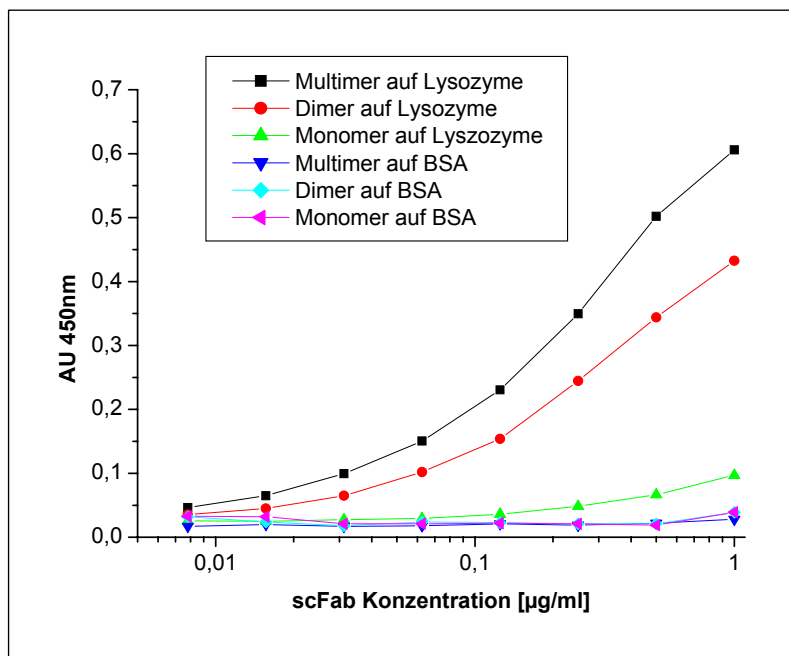


Abb. 3.21: Antigen-ELISA mit Lysozym zur Funktionsbestimmung der D1.3-scFabΔC Monomere und größerer Aggregate. Ausgehend von der Gelfiltrationschromatographie wurden die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen einander angepasst und für jedes Aggregat bzw. die Monomerfraktion eine Verdünnungsreihe von 1 µg/mL bis 8 ng/mL hergestellt. Im ELISA wurde Lysozym bzw. BSA (Negativkontrolle) an die Vertiefungen der Platte immobilisiert. Die Detektion der gebundenen D1.3-scFabΔC-Moleküle erfolgte durch HRP-gekoppeltes ProteinL. Die Messungen fanden in Duplikaten bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm statt.

3.8.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung des D1.3-sclgGs

Das Design des sclgGs ist im Hinblick auf die Fusion der schweren und leichten Ketten im Punkt des verwendeten Peptidlinkers und der Verknüpfung des C-terminalen Endes der leichten Kette mit dem N-Terminus der schweren Kette identisch zum scFabΔC (Abb. 3.18). Die Klonierung der humanen Hinge- und Fc-Region (IgG₁) erfolgte über die PCR amplifizierte Gensequenz mit den Restriktionsschnittstellen *NheI* am 5' Ende (Isoschizomer zu *XbaI*) und *XbaI* am 3' Ende. Das DNA-Template für die PCR-Reaktion war der Vektor (pSH1-215). Als Akzeptorvektor diente der Expressionsvektor pPICZalphaA-D1.3-scFab, dessen vor dem

Stopcodon existierende *Xba*I Restriktionsschnittstelle für die Klonierung der Hinge-Fc-Region verwendet wurde. Der resultierende Vektor war pPICZalpha-D1.3-sclgG.

Bei der Expression in *P.pastoris* KM71 wurde aufgrund von proteolytischer Aktivität an zwei Proteasespaltstellen in der C-terminalen C_H1-Domäne (Arg464) bzw. in der Hinge-Region (Lys473) der produzierte sclgG degradiert. Die Identifizierung der Spaltstellen erfolgte mittels N-terminaler Sequenzierung der isolierten Fragmente.

Aufgrund der Proteaseaktivität wurde parallel die transiente Expression des sclgGs in Hek293T-Zellen untersucht. Für den Expressionsvektor pCMV-D1.3-sclgG wurde zunächst die D1.3-sclgG-Gensequenz des Vektors pPICZalpha-D1.3-sclgG, inkl. einer am 5' Ende des DNA-Fragments eingeführten *Bss*HII-Schnittstelle amplifiziert. Anschließend wurde die Gensequenz in den Säugerzellexpressionsvektor pCMV-myc-ER über die Restriktionsschnittstellen *Bss*HII und *Xba*I kloniert.

Für die Expression wurden Hek293T Zellen in vier 10 cm Petrischalen (90% Konfluenz) mit pCMV-D1.3-sclgG transfiziert und bei Ernte des Mediums im 2 Tagesrhythmus für 2 Wochen inkubiert. Die filtrierten Medienüberstände wurden über ProteinA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Analyse des aufgereinigten sclgGs im reduzierenden SDS-Gel weist eine apparente Bande von ~75 kDa auf. Im nicht-reduzierenden SDS-Gel liegt die sclgG-Bande bei über 250 kDa, was einem IgG-typischen Laufverhalten entspricht (Abb. 3.22).

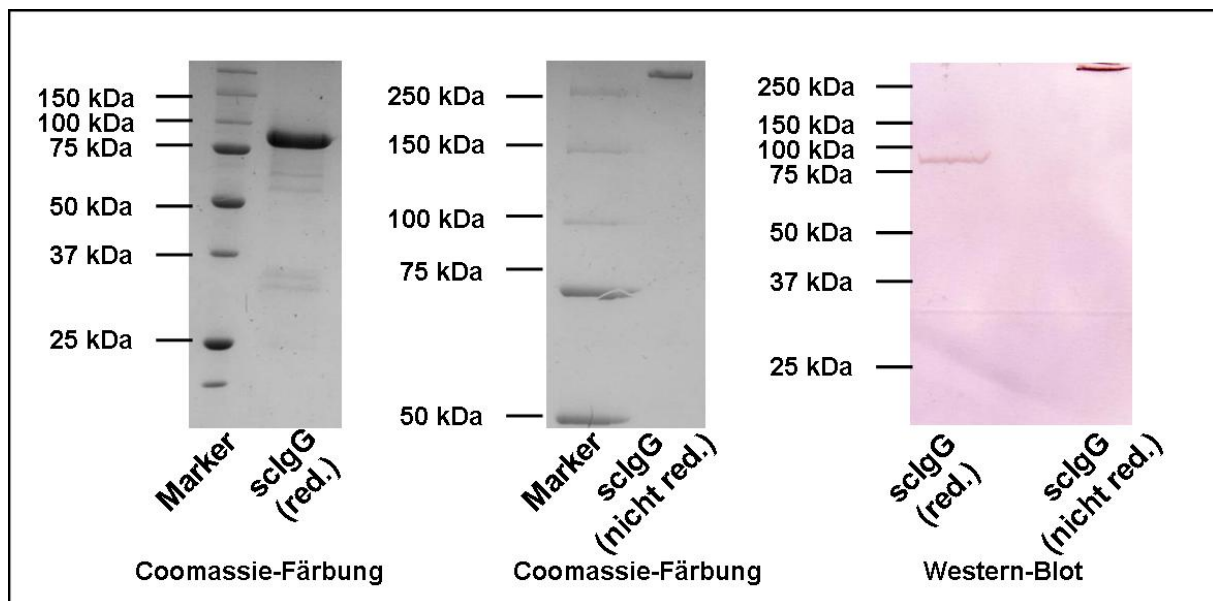


Abb. 3.22: SDS-PAGE und Immunoblot des ProteinA aufgereinigten D1.3-sclgGs. D1.3-sclgG wurde aus dem Kultivierungsüberstand der transienten Expression in Hek293T Zellen über ProteinA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Elutionsfraktion wurde gepoolt und gegen PBS dialysiert. Anschließend erfolgte die Analyse im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (10%; Coomassie), die eine deutliche Bande bei ca. 75 kDa zeigt. Im nicht-reduzierten SDS-Gel (8%, Coomassie) liegt die sichtbare sclgG-Bande bei über 250 kDa. Im Immunoblot sind die entsprechenden Banden des reduzierten sclgG bei 75 kDa und die der nicht reduzierten Probe bei über 250 kDa spezifisch angefärbt.

Im Immunoblot konnte zusätzlich verifiziert werden, dass es sich bei den Proteinbanden um einen scIgG handelt. Der Nachweis erfolgte dabei mit einem AP-gekoppelten α -human-IgG-(Fc spezifisch)-Antikörper und weist Proteine bei 75 kDa für die reduzierte Probe und bei über 250 kDa für die nicht reduzierte Probe nach.

Bei der weiteren Charakterisierung des D1.3-scIgGs zeigte sich in der analytischen Gelfiltration ein anderes Bild als beim scFab Δ C. Der scIgG lag zu fast 80% als Monomer, bestehend aus den beiden über intermolekulare Disulfidbrücken verbundene Polypeptidketten vor (Abb. 3.23). Nur jeweils etwa 10% der aufgereinigten scIgGs waren Dimere bzw. Multimere. Die Bestimmung der Ausbeute an Monomeren scIgG ergab 120 μ g/L.

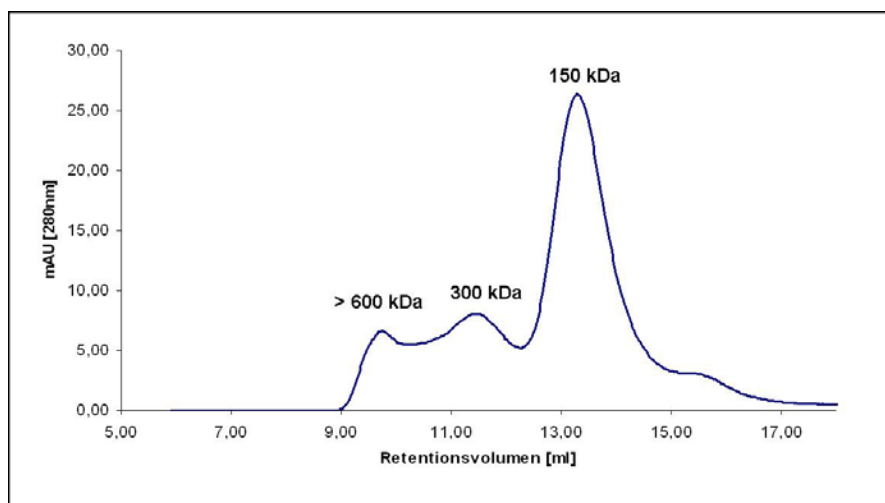


Abb. 3.23: Analytische Gelfiltration des ProteinA gereinigten D1.3-scIgG. Der Lauf wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min auf einer kalibrierten Superdex 200 Säule durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 500 μ L. Die Retentionsvolumina der Elutionspeaks betrugen 13,2 mL (monomerer scIgG; 150 kDa), 11,5mL (dimerer scIgG; 300 kDa) und 9,8 mL (multimere Aggregate; >600 kDa).

Für die Analyse der Bindung wurden die Monomer, Dimer und Multimer entsprechende Fraktionen der Gelfiltration auf eine Proteinkonzentration von 100 ng/mL verdünnt und im ELISA untersucht (Abb. 3.24). Die im Antigen-ELISA eingesetzten D1.3-scIgG-Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 0,02 ng/mL und 13 ng/mL. Die gebundenen scIgG Moleküle wurden mittels eines HRP-gekoppelten Ziege- α -human-IgG-(Fc-spezifisch)-Antikörper detektiert.

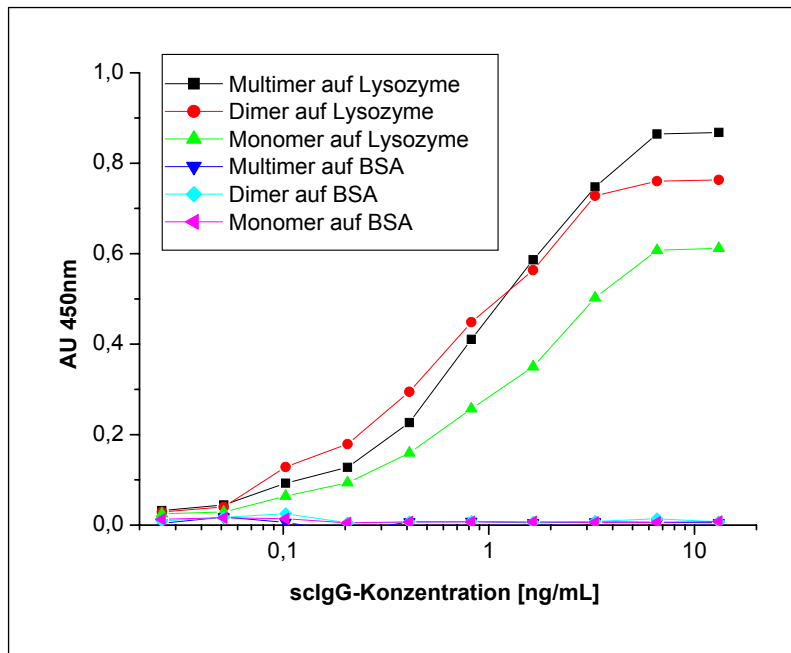


Abb. 3.24: Antigen-ELISA mit Lysozym zur Funktionsbestimmung der D1.3-sclgG Monomere und größerer Aggregate. Ausgehend von der Gelfiltrationschromatographie wurden die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen einander angepasst, und für jedes Aggregat bzw. die Monomerfraktion eine Verdünnungsreihe von 13 ng/mL bis 0,02 ng/mL hergestellt. Im ELISA wurde Lysozym bzw. BSA (Negativkontrolle) an die Vertiefungen der Platte immobilisiert. Die Detektion der gebundenen D1.3-sclgG-Moleküle erfolgte durch HRP-gekoppelten Ziege α -human-IgG-(Fc spezifischen)-Antikörper. Die Ansätze wurden als Duplikate ausgeführt und bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm gemessen.

Zusätzlich wurde die Antigen-Bindungseigenschaft des D1.3-sclgG inkl. der Assoziations-, Dissoziationsrate und Affinität mittels Oberflächenplasmonresonanz bestimmt. Für die Durchführung der Messung wurden zuvor auf der ersten Flußzelle eines CM5 Chip das Antigen Lysozym und auf der zweiten Flußzelle BSA als Negativkontrolle kovalent gekoppelt.

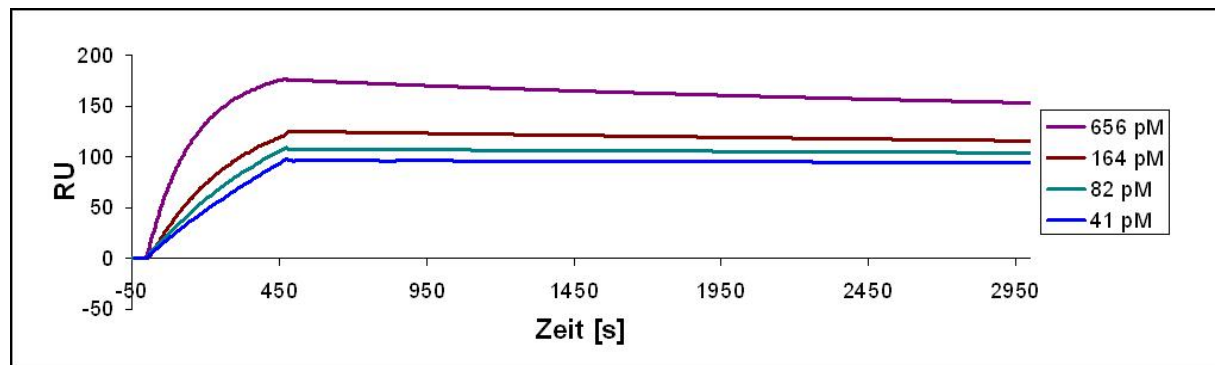


Abb. 3.25: Overlay-Plot der am BIAcore2000 gemessenen Sensogramme von D1.3-sclgG (Monomerfraktion). Es wurden Sensogramme von verschiedenen Konzentrationen sclgG aufgenommen. Auf dem dabei verwendeten CM5 Chip wurde Hühnereiweiß-Lysozym bzw. BSA (Negativkontrolle) kovalent gekoppelt. Die eingesetzten Konzentrationen an D1.3-sclgG betrugen 41 pM, 82 pM, 164 pM und 656 pM.

Für die Messung wurden verschiedene sclgG Konzentrationen von ~41 pM bis zu 656 pM eingesetzt. Diese Verdünnungen stammen aus der Elutionsfraktion des monomeren sclgG. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, erfolgte zudem eine Doppelbestimmung des Sensogramms für die Konzentration 164 pM (Daten der Doppelbestimmung nicht gezeigt). Der Verlauf des Overlay-Plots verdeutlicht die geringe Dissoziationsrate ($k_{\text{off}} = 4,62 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (Abb. 3.25). Zusätzlich wurden für den sclgG eine aparente Affinität von 176pM und eine Assoziationsrate von $2,62 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt.

4 Diskussion

In der Krebstherapie kommen vielfältige antikörperbasierte Therapieformen zum Einsatz oder befinden sich in der Erforschung. Die Mehrheit der zytotoxischen Wirkprinzipien beruht auf Mechanismen, die bezogen auf die Krebszelle extrazellulärer Natur (z.B. Aktivierung des Komplementsystems, Rekrutierung von NK-Zellen, ionisierende Strahlung) sind. Im Gegensatz dazu ist bei dem Einsatz von Antikörper-Toxin-Konjugaten (Immuntoxine) und Antikörper-RNase Fusionsmolekülen (*Targeted RNase*, TR) die Zytotoxizität nur gegeben, wenn die Moleküle ins Zellinnere, in das Zytoplasma gelangen. Für den Bereich der Immuntoxine existieren zahlreiche Beispiele, in denen tumorspezifische Antikörper mit den verschiedensten Toxinen, bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs, gekoppelt wurden, die aber oftmals in den klinischen Studien aufgrund ihrer unerwünschten Nebenwirkungen, wie unspezifische Toxizität, Immunogenität aber auch mangelnde *in vivo*-Wirksamkeit gescheitert sind (Kneba *et al.* 2001). Im Gegensatz zu Immuntoxinen wurden tumorspezifische TRs hingegen bislang nur in wenigen Studien untersucht (De Lorenzo *et al.* 2004, Krauss *et al.* 2005, Chang *et al.* 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Konzept der Antikörper-RNase Fusionsproteine für den potentiellen Einsatz in der Krebstherapie mit rekombinanten Antikörperfragmenten, spezifisch für den Tumormarker CD30 validiert werden. In diesem Zusammenhang sollte im Gegensatz zu den bisherigen Studien erstmals ein vollständig humanes Antikörper-RNase-Fusionskonstrukt erzeugt und eingesetzt werden.

Der Antikörperanteil des TR-Fusionsproteins erlaubt eine spezifische Bindung an die Zielzellen. Im Vergleich zu den relativ unspezifischen Strahlen- und Chemotherapien bedeutet diese Spezifität einen Effizienzvorteil in der antikörperbasierten Krebstherapie. Zugleich könnte diese höhere Spezifität zur Verringerung der Nebenwirkungen führen, die durch die systemische Toxizität von Radioisotopen oder Zytostatika verursacht werden (Wu und Senter 2005). Die Fusion von Antikörpern mit der RNase könnte auch Vorteile gegenüber den Immuntoxinen haben. RNasen verfügen über keine toxische Wirkung außerhalb der Zellen. Sie können nach Aufnahme in die Zelle, z.B. durch rezeptorvermittelte Endozytose in Verbindung mit Antikörper- oder Peptidfusionen und Freisetzung im Zytoplasma ihre toxische Wirkung entfalten. Zum anderen sind RNasen u.a. im Serum des menschlichen Körpers im Überschuss vorhanden, d.h. sie sollten nicht oder sehr gering immunogen sein, so dass das menschliche Immunsystem keine neutralisierenden Antikörper bildet (Breitling und Dübel 1997).

Ausgangspunkt für diese Arbeit war ein humanes scFv-Antikörperfragment, das spezifisch den Zelloberflächenrezeptor CD30 bindet (Dr. Konthur, unveröffentlichte Daten). Bei CD30 handelt es sich um ein stark glykosyliertes Transmembranprotein (Typl), welches auf

hämatopoetischen Zellen (aktivierten bzw. proliferierenden Lymphozyten) exprimiert wird. CD30 dient in der Hämatologie als ein charakteristischer Tumormarker zur Identifizierung bestimmter Arten von Lymphomen (HL, ALCL, ATL). CD30 wurde als Modellrezeptor für die Untersuchung des Antikörper-RNase-Konzepts verwendet, da nach der Antikörperbindung an CD30 eine rezeptorvermittelte Endozytose stattfindet (Hansen *et al.* 2002).

Die humane RNase wurde aufgrund ihrer geringen Immunogenität verwendet. Die zytotoxische Wirkung der RNase basiert auf der katalytischen Spaltung von RNA im Zytoplasma der Zielzellen. Deshalb musste die RNase-Aktivität untersucht werden. Außerdem musste eine potentielle Inhibition der RNase-Aktivität in den TR-Konstrukten durch den in Säugerzellen ubiquitär vorhandenen RNase-Inhibitor ausgeschlossen werden.

Im ersten Schritt musste ein geeignetes Antikörperformat erzeugt werden, wobei die Produzierbarkeit, die Spezifität und Affinität des Antikörpers im Vordergrund stand. Im Anschluss wurde das Antikörperformat auf das TR-Fusionsprotein übertragen und die Funktionalität der einzelnen Fusionsdomänen, der Transport des Fusionsmoleküls ins Zytoplasma und die katalytische Aktivität der RNase untersucht.

4.1 Aufbau des Antikörper-RNase-Fusionskonstrukts

Um für den Ansatz des *Targeted RNase*-Konzeptes das optimale Antikörperformat zu identifizieren, wurde die Bindung der drei erzeugten Antikörperformate scFv, IgG und scFv-Fc an natives CD30 untersucht. Neben ihrer Affinität zu CD30 wurden die Antikörperformate hinsichtlich ihrer Stabilität und ihrem Aggregationsverhalten analysiert und miteinander verglichen. Dieselben Eigenschaften wurden ebenfalls bei den generierten TR-Fusionskonstrukten untersucht. Der Aufbau der *Targeted RNasen* wurde mit Berücksichtigung bereits existierender Antikörperfusionsmolekülen konzipiert (Rybak *et al.* 1991, Zewe *et al.* 1997, De Lorenzo *et al.* 2004). Dabei wurde die humane RNase über einen kurzen Peptidlinker mit scFv in unterschiedlicher Orientierung verbunden. Außerdem wurden scFv-Fc-RNase und scFv-RNase-Fc-Konstrukte erzeugt.

Sämtliche Antikörperformate und TRs ließen sich gut produzieren und wurden über ProteinA bzw. ProteinL aufgereinigt. Bei der Untersuchung der Reinheit der Konstrukte nach der Chromatographie wiesen α CD30-IgG, α CD30-scFv-RNase und α CD30-scFv-RNase-Fc Verunreinigungen auf, die durch Silberfärbung nachgewiesen werden konnten (Nachweisgrenze ca. 2 ng/ μ L). Die Kontrolle, ob es sich bei den Verunreinigungen um Degradationsprodukte handelt, erfolgte mittels Immunoblots mit einem spezifischen Nachweis mit Antikörpern gegen die humane pankreatische RNase oder gegen die Fc-Domäne der Antikörper. Dabei zeigte sich, dass nur bei der scFv-RNase die zusätzlichen Proteinbanden auf das Fusionsmolekül zurückgeführt werden konnten. Im Fall des IgGs und

des scFv-RNase-Fc-Konstrukts konnte die Ursache für die Verunreinigung nicht in der Degradation der Antikörpermoleküle liegen (Daten nicht gezeigt). Da der spezifische Nachweis des humanen pankreatischen RNase-Anteils der TR-Konstrukte im Immunoblot keine Abbauprodukte des scFv-Fc-RNase-Fusionsmoleküls zeigte, konnte von der Stabilität des Peptidlinkers zwischen scFv und RNase ausgegangen werden. Dies ist für die weitere Analyse wichtig, damit keine Konkurrenz von degradierten, katalytisch inaktiven, aber noch zur Antigenbindung befähigten TR-Molekülen um die Antigenbindungsstellen von CD30 stattfindet und störende Einflüsse bei zellbiologischen Untersuchungen ausüben.

Der bei der Auswahl der einzelnen Komponenten berücksichtigte Aspekt der Immunogenität spielt nicht nur bei einem heterologen Ursprung der RNase (bzw. einzelner Komponenten) eine Rolle, sondern auch bei strukturellen Faktoren wie Sequenzvariationen und bei Glykosylierung bzw. Lagerungsbedingungen. Die Folge kann die Denaturierung oder Aggregation des Proteins sein, wobei insbesondere die Aggregatbildung als auslösender oder zumindest verstärkender Faktor für eine Immunantwort gegen therapeutisch eingesetzte Proteine diskutiert wird. (Schellekens 2005). Eine mögliche Proteinaggregation der Antikörper- bzw. TR-Konstrukte wurde mittels Gelfiltration untersucht. Bei sämtlichen Antikörper und TR-Konstrukten war keine Multimerisierung auch bei 4-wöchiger Lagerung bei 4°C nachweisbar.

Die Ergebnisse des ELISA mit CD30-Fc als Antigen bestätigen die Antigenspezifität der α CD30-Antikörper- und TR-Konstrukte. Für die Beurteilung der verschiedenen CD30-spezifischen Antikörperformate ist die Affinität ein wichtiges Qualitätskriterium, die bei den hergestellten Antikörperformaten von $5,6 \times 10^{-7}$ M bis zu $9,8 \times 10^{-10}$ M reichte. Um die Affinitäten zu bestimmen, wurde das Verfahren der Oberflächenplasmonresonanz unter Verwendung eines BIAcore 2000 Gerätes eingesetzt. Bei der Analyse der Interaktion von Antigen und Antikörper wurde CD30-Fc als Antigen eingesetzt. Für den scFv wurde die geringste Affinität der konstruierten Antikörperformate mit $5,6 \times 10^{-7}$ M gemessen. Der α CD30-IgG hatte mit $1,68 \times 10^{-8}$ M eine ~35-fach höhere apparente Affinität, verglichen mit dem scFv-Format, was vermutlich auf die Bivalenz des Antikörpers zurückzuführen ist. Die Dissoziationsrate des IgGs mit $k_{\text{off}} = 168 \text{ s}^{-1}$ war jedoch vergleichsweise hoch. Bei *in vivo* affinitätsgereiften IgGs liegt sie i.d.R. im Bereich von 10^{-3} s^{-1} bis 10^{-4} s^{-1} (Foote, J. und Eisen, H.N. 1995). Die durch die hohe Dissoziationsrate bedingte geringe Affinität des IgGs ist durch eine mögliche konformationelle Änderung bei der Zusammenlagerung der antigenbindenden Bereiche V_L und V_H erklärbar, da im Fab- und IgG-Format V_L und V_H in ihrer Zusammenlagerung durch die C-Domänen im Vergleich zum scFv eingeschränkt sind. Während V_H und V_L durch den Glycin-Serin Peptidlinker im scFv-Format über eine hohe Flexibilität in der Anordnung verfügen, ist die Flexibilität im Fab- und IgG-Format durch die konstanten Domänen (C_H1 und C_L) und damit ihre konformationelle Anordnung reduziert.

Eine möglicherweise inkorrekte Prozessierung der leichten oder schweren Kette des IgG kann als Ursache für die niedrige Affinität ausgeschlossen werden, da die N-terminale Sequenzierung der Ketten keine fehlenden Aminosäuren am N-Terminus der Ketten ergab. Die Bestimmung der apparenten Affinität des produzierten scFv-Fc-RNase Fusionsproteins mit $9,8 \times 10^{-10}$ M ergab eine 570-fach höhere Affinität im Vergleich zum scFv, deren Ursache in der bivalenten Präsentation des scFv-Fragments liegt. Dieser Befund unterstützt die frühere Schlussfolgerung, dass die geringe Affinität des IgGs durch eine suboptimale Konformation der V-Regionen im Fab verursacht wird. Die k_{on} -Rate des scFv-Fc-RNase-Formats betrug $5,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und die gemessene k_{off} -Rate betrug $5,6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

Im Vergleich zu einem über transgene Mäuse isolierten humanen CD30-spezifischen Antikörper, dessen ermittelte Affinität bei ~ 600 pM und dessen Assoziations- bzw. Dissoziationsrate bei k_{on} $5,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und k_{off} $3,1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ liegen, weist das scFv-Fc Format eine ähnlich hohe Affinität auf (Borchmann *et al.* 2003).

Die Bindung der konstruierten Antikörperformate bzw. TR-Konstrukte an natives CD30 wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der Nachweis erfolgte mit der CD30-positiven Karpas 299 Zelllinie, die von einem großzelligen anaplastischen Lymphom (T-Zell-Lymphom) abstammt (Fisher *et al.* 1988). In der FACS-Analyse spiegeln sich die über Oberflächenplasmonresonanz ermittelten Affinitäten wider. Die Antikörperformate mit geringer Affinität im μM -Bereich (scFv und IgG) zeigen nur eine schwache Bindung in der durchflusszytometrischen Messung. Zudem mussten hohe Konzentrationen von über 10^6 Zellen eingesetzt werden, während für die scFv-Fc-, scFv-Fc-RNase- und scFv-RNase-Fc-Konstrukte mit den apparanten Affinitäten im nM- bis pM-Bereich zur Färbung der CD30⁺ Karpas 299 Zellen in der Durchflusszytometrie bereits Konzentrationen von weniger als $1 \mu\text{g}$ pro 10^6 Zellen ausreichen. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen, der verschiedenen Antikörperformate wurde nicht davon beeinflusst, ob eine Fusion mit RNase vorlag oder nicht. Für die Negativkontrolle wurde die CD30-negative Zelllinie HD-MY-Z eingesetzt, die aus der nodulären-sklerosierenden Form eines Hodgkin Lymphoms isoliert wurde (Bargou *et al.* 1993). Bei keinem der Antikörperformate konnte eine Bindungsreaktion gegen diese Zelllinie in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die auf dem scFv basierenden Antikörperformate spezifisch an natives CD30 binden.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Bindungsstudien erfolgte in den nachfolgenden Untersuchungen eine Beschränkung auf die scFv-Fc-RNase bzw. scFv-RNase-Fc Fusionsproteine, da nur sie aufgrund ihrer Affinität bzw. Avidität eine starke Bindung an CD30 exprimierende Tumorzelllinien zeigten.

Eine weitere Anwendung der verbliebenen Antikörperformate scFv und IgG ist nur sinnvoll, wenn eine Affinitätserhöhung mit bis zu nano- bis picomolaren Affinitäten erfolgen würde. Für

das scFv-Fragment wäre die Affinitätsreifung insbesondere bei Krebstherapien von soliden Tumoren von Bedeutung, da hier zur verbesserten Penetration vor allem möglichst kleine Antikörperfragmente eingesetzt werden. Da es sich bei CD30 positiven Lymphomen um hämatologische Tumore handelt, ist die molekulare Größe des Fusionsproteins jedoch nicht von primärer Bedeutung. Diese sind im Vergleich zu soliden Tumoren wesentlich besser zugänglich, da die Lymphome meist im Blut oder den lymphatischen Organen vorhanden sind (Kneba *et al.* 2001).

Die weitere Voraussetzung für den Einsatz von *Targeted RNase*-Konstrukten ist die katalytische Aktivität der RNase zur Vermittlung der Zytotoxizität über die Inhibition des Translationsapparates im Zytoplasma der Zielzellen. Mögliche Faktoren, von denen die Aktivität der RNase beeinflusst werden kann, sind die Orientierung der Fusion, d.h. C- oder N-terminale Fusion von Antikörperfragment und RNase, Länge des eingesetzten Peptidlinkers und Sensitivität der RNase gegenüber zytosolischen RNase-Inhibitoren.

In dieser Arbeit wurde die humane pankreatische RNase (RNase1) verwendet, da sie sich in Antikörper-RNase-Fusionsmolekülen als doppelt so aktiv erwies wie RNase2 (Eosinophil-derived Neurotoxin). RNase1 inhibiert stärker die Proteinsynthese (gemessen als *in vitro*-Translation), mit einer IC_{50} von 4 nM für RNase1 im Vergleich zu einer IC_{50} von 8 nM für RNase2 (Zewe *et al.* 1997). Das humane Angiogenin (Ang, RNase5) wurde nicht verwendet, da es über eine 10^4 - 10^6 -fach geringere katalytische Aktivität verfügt als RNase1 (Harper und Vallee 1988, Saxena *et al.* 1992, Sorrentino und Libonati 1994).

Es existiert keine systematische Untersuchung über den Einfluss der Länge des Peptidlinkers in Fusionsmolekülen auf die Aktivität von RNase1. Lediglich in zwei Untersuchungen zu Antikörper-RNase1-Fusionsmolekülen: RNase1-aCD71scFv (Zewe *et al.* 1997) und her2/neu-scFv-RNase1 (De Lorenzo *et al.* 2004) setzen unterschiedliche Linker von 13 Aminosäuren (FB-Linker abgeleitet vom Staphylococcus ProteinA) bzw. 11 Aminosäuren (AAASGGPEGGS) ein. Diese Studien zeigten außerdem, dass die Orientierung der Fusion bei der RNase1, im Gegensatz zu anderen RNasen z.B. Onconase aus *Rana pipiens*, nicht von Bedeutung ist. Die Ursache ist in der Struktur der RNase1 begründet, da der N-Terminus (Aminosäuren 1-9), im Gegensatz zur Onconase, nicht am katalytischen Zentrum beteiligt ist (Boix *et al.* 1996).

Die Messung der RNase-Aktivität von CD30-spezifischen Antikörper-RNase-Fusionsproteinen wurde über *in vitro*-Translation von Luziferase-mRNA mit Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen vorgenommen. Im Anschluss wurde der Translationsansatz auf Luziferase-Aktivität untersucht. Die C-terminale Fusion der RNase im scFv-Fc-RNase-Konstrukt und im scFv-RNase-Konstrukt erfolgte über einen 6 Aminosäure langen Peptidlinker (AAASSG). In beiden Konstrukten, ebenso wie in dem bovinen RNase A-Kontrollansatz war die RNase aktiv. Eine geringe Kontamination der Proben mit RNase

konnte nicht ausgeschlossen werden, da in den parallel produzierten scFv-Fc-Proteinen im Vergleich zur RNase-freien PBS-Kontrolle (Lumineszenzsignal: 100%) eine RNase-Aktivität mit einem 60%igen Lumineszenzsignal detektierbar war. Im Fall der scFv-RNase-Fc-Fusion war keine RNase-Aktivität detektierbar, die über die Aktivität der scFv-Fc-Kontrolle hinausging. Aus den Ergebnissen konnte auch bei einem verkürzten Linker auf eine ausreichende Flexibilität in der räumlichen Anordnung von RNase und Antikörper geschlossen werden. Die Fusion der RNase zwischen scFv- und Fc-Domäne im scFv-RNase-Fc-Format schränkt die Flexibilität und die sterische Zugänglichkeit des aktiven Zentrums der RNase vermutlich ein, so dass die Umsetzung des RNase-Substrates am aktiven Zentrum verhindert wird.

Zusätzlich wurde die Sensitivität der scFv-Fc-RNase auf RNase-Inhibitoren (RI) untersucht, da bekannt ist, dass die Aktivität von RNasen stark vom zytosolischen RI inhibiert werden kann. Im Zytoplasma von Zellen kann der RI-Proteingehalt zur dortigen Gesamtproteinmenge mehr als 0,01% ausmachen. *In vitro*-Untersuchungen ergaben, dass RI einen hoch affinen Komplex mit der RNase1 ausbildet ($K_D \sim 10^{-14}M$) und das aktive Zentrum der RNase vor dem Eintritt der RNA-Substrate abschirmt (Roth *et al.* 1966, Blackburn *et al.* 1982, Lee *et al.* 1989 und Kobe und Deisenhofer 1996). Für die humane RNase1 ist bekannt, dass sie trotz ihrer hohen Ribonuklease-Aktivität aufgrund der Inhibition durch den zytosolischen RI nicht mehr zytotoxisch wirkt (Kim *et al.* 1995). Die Ausbildung des RI-RNase-Komplexes kann jedoch durch die Fusion von anderen Protein-Domänen an die RNase verhindert werden (Suzuki *et al.* 1999).

Daher sollte die zusätzliche Untersuchung der RNase-Aktivität unter Zugabe von RNase-Inhibitor-Protein Aufschluß über eine mögliche sterische Blockade von RI in dem Antikörper-RNase Fusionsprotein geben. Von dem verwendeten rekombinanten RNase Inhibitor (RNasin, Promega) ist bekannt, dass er pankreatische RNase (RNase 1, RNase A), RNase 5 (Ang) und zahlreiche weitere RNasen inhibiert und zu über 95% homolog zum humanen RI der Plazenta ist (Lee *et al.* 1989). Dies zeigt sich in dem Kontrollansatz mit boviner RNase A, bei dem das Lumineszenzsignal >5% bezogen auf das maximale Lumineszenzsignal bei der RNase-freien PBS-Kontrolle betrug, während die RNase-Aktivität des scFv-Fc-RNase Konstrukts weiterhin unbeeinflusst blieb. Dies lässt darauf schließen, dass die humane RNase1 im vorliegenden Fusionsprotein scFv-Fc-RNase *in vitro* nicht von dem zugegebenen RI inhibiert wird, so dass keine Inhibition der Zytotoxizität in Gegenwart von RI im Zytoplasma erwartet werden kann.

Für den Einsatz als *Targeted RNase* war das scFv-Fc-RNase-Fusionskonstrukt allen anderen in dieser Arbeit erzeugten TR-Konstrukten überlegen. Dieses Format ist in Säugerzellexpressionssystemen gut produzierbar und zeigt selbst nach längerer Lagerung bei 4°C weder Degradation noch eine Tendenz zur Aggregation. Zudem verfügt das scFv-Fc-

RNase-Konstrukt über eine hinreichend hohe Affinität und ist in der Lage, an CD30-exprimierende Lymphomzellen in der Durchflusszytometrie zu binden. Zusätzlich wird die katalytische Aktivität der RNase durch die Fusion nicht beeinträchtigt. Die C-terminale Fusion der RNase an das scFv-Fragment führt sogar zu einer sterischen Blockade der RI-Bindung und damit zum Schutz vor Inhibition der RNase-Aktivität durch den RI im Zytosol.

4.2 Targeted RNase als Krebstherapie für internalisierende Tumormarker

Um den tatsächlichen Nutzen des α CD30-scFv-Fc-RNase-Fusionsproteins als *Targeted RNase* im Fall eines klinisch relevanten Tumormarkers zu untersuchen, wurden zellbiologische Untersuchungen zur rezeptorvermittelten Endozytose und Wachstumsinhibition mit einer CD30⁺ Lymphomzelllinie durchgeführt. Außerdem wurde die ADCC-Aktivität der scFv-Fc-RNase *in vitro* untersucht, die die Wirkung der TR-Konstrukte unterstützen könnte.

Obwohl für CD30 bereits die Fähigkeit zur Internalisierung von rezeptorspezifischen Antikörpern beschrieben wurde (Hansen *et al.* 2002), musste der Nachweis zur Internalisierung für die in dieser Arbeit konstruierte *Targeted RNase* nach der spezifischen Bindung an die Zelloberfläche der CD30 positiven Zellen erbracht werden. Dazu wurden bei unterschiedlichen Bedingungen Karpas 299 Zellen mit dem *Targeted RNase*-Konstrukt (α CD30-scFv-Fc-RNase) inkubiert. Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Endozytose wurde die Temperaturabhängigkeit zellulärer Vorgänge ausgenutzt. Eine Temperatur von 4°C, die wesentlich unterhalb der physiologischen Temperatur von 37°C liegt, verursacht eine deutliche Verlangsamung aktiver zellulärer Abläufe, wie der Endozytose (Roupas und Herington 1987, Lee *et al.* 2001). Die Ergebnisse der Internalisierungsstudien zur zellulären Verteilung der *Targeted RNase* unterschieden sich in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Bei 4°C zeigte sich bei den Karpas 299 Zellen eine Lokalisation der *Targeted RNase*-Moleküle auf der Zelloberfläche. Hingegen erwies sich bei der Inkubationstemperatur von 37°C, dass die *Targeted RNase*-Moleküle in intrazellulären Vesikeln über das gesamte Zytoplasma verteilt lokalisiert waren, wie es bei einer rezeptorvermittelten Endozytose von Liganden erwartet wird (Wei *et al.* 1998, Lee *et al.* 2001). Es fand keine Untersuchung zum intrazellulären retrograden Transport und der Translokation der *Targeted RNase*-Konstrukte ins Zytoplasma statt. Untersuchungen zur Internalisierung der sekretorischen RNasen, RNase A und Onconase, zeigten eine Dynamin-unabhängige Endozytose der RNase-Moleküle, deren Translokation ins Zytoplasma vermutlich über die Endosomen erfolgt, da ein retrograder Transport über den Golgi-Apparat und das ER ausgeschlossen werden konnte (Haigis *et al.* 2003). Dies würde mit Ausnahme

der pH-Unabhängigkeit der Translokation von RNasen dem Translokationsvorgang des Diphtheriatoxins ähneln, dessen Wirksamkeit und zytoplasmatische Lokalisierung als Antikörper-Toxinkonjugat belegt ist (Merion *et al.* 1983). Für die RNasen und *Targeted RNase*-Moleküle ist ein analoger Translokationsmechanismus denkbar (Vallera *et al.* 2005). Ein CD30-Shedding durch Abspaltung der extrazellulären Domäne von CD30 durch die Metalloprotease TACE (tumor necrosis alpha-factor converting enzyme) könnte für die CD30-spezifischen TR-Konstrukte problematisch sein. Viele CD30-spezifische Antikörper verstärken durch ihre Bindung den Level an freigesetzten löslichen CD30 durch konstitutive Spaltung. Das Shedding von CD30 könnte die Effizienz einer antikörperbasierten Krebstherapie als auch die rezeptorvermittelte Internalisierung vermindern (Hansen *et al.* 2002). Für zwei Antikörper (Ber-H2 und Ki-4), deren Epitop durch Sequenzduplikation auf den cysteinreichen Regionen 2 und 5 des humanen CD30 liegen, ist eine inhibierende Auswirkung auf das Shedding von CD30 bekannt (Hansen *et al.* 2004). Für die Bindung der *Targeted RNase*-Konstrukte und der zugrunde liegenden Antikörperfragmente an CD30 wurde die proteaseinduzierte Abspaltung der extrazellulären Domäne von CD30 nicht weiter untersucht.

Neben der Internalisierung der *Targeted RNase*-Moleküle ist die funktionelle Aktivität der RNase des Fusionskonstrukts wichtig. Nach Aufnahme und Freisetzung verursacht sie die zytotoxische Wirkung auf die Zielzelle. Deshalb wurde *in vitro* die zytotoxische Aktivität des TR-Konstruktes auf die CD30⁺ Tumorzelllinie Karpas 299 ermittelt. Hierzu wurde die Proliferation der Tumorzellen über eine Dauer von 4 Tagen anhand der Gesamtzellzahl bei der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an *Targeted RNase* gemessen. Die IC₅₀ lag für das scFv-Fc-RNase-Konstrukt auf Karpas 299 Zellen bei 3,3 nM und ist vergleichbar mit der IC₅₀ von 0,27 nM, die für das Fusionsprotein des CD30-Liganden mit der humanen RNase Angiogenin auf CD30⁺ HL-Zelllinie L540 ermittelt wurde (Huhn *et al.* 2001). Die Antigenbindung von Antikörpern kann im Fall von CD30 durch antikörperinduzierte Rezeptortrimerisierung einen antiproliferativen Einfluss auf CD30⁺ Zellen ausüben (Hübinger *et al.* 2001). Dieser Effekt wurde jedoch mit dem αCD30-scFv-Fc-Protein (ohne RNase Fusion) nicht nachgewiesen bzw. war nicht signifikant. Die Proliferationshemmung der CD30⁺ Zellen kann auf die RNase-Domäne zurückgeführt werden, da für die Kontrolle mit dem αCD30-scFv-Fc-Protein keine oder nur eine sehr geringe Inhibition der Proliferation ausging. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem für den humanen CD30-spezifischen Antikörper 5F11 publizierten Untersuchungen zur *in vitro* Wachstumsinhibition auf Karpas 299 und L540-Zellen, deren Proliferation von diesem Antikörper nicht beeinflusst wurde (Borchmann *et al.* 2003).

Obwohl die Proliferation der CD30⁺ Karpas 299-Zellen erfolgreich durch die zytotoxische Wirkung der aufgenommenen *Targeted RNase* unterdrückt werden konnte, wurden nicht alle

Karpas 299 Zellen abgetötet. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in dem sehr heterogenen CD30-Expressionslevel der Karpas 299 Zellen liegen, wie durch die durchflusszytometrischen Messungen gezeigt wurde.

Die *Targeted RNase* α CD30-scFv-Fc-RNase könnte aufgrund ihres Fc γ 1-Teils IgG₁-ähnliche Effektorfunktionen ausüben. Deshalb wurde *in vitro* die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) untersucht. In den Kontrollexperimenten wurde das CD30-spezifische scFv-Fc-Fusionsprotein eingesetzt.

Die *Targeted RNase* vermittelt in den Versuchen keine ADCC gegen die CD30-exprimierende Tumorzelllinie Karpas 299. Das TR-Konstrukt ist nicht in der Lage Effektorzellen (i.d.R. NK-Zellen) über die Fc Fc-Rezeptor Interaktion zur Zellyse zu rekrutieren. Über die Ursache können nur Vermutungen angestellt werden, aber es ist nicht auszuschließen, dass die für die ADCC notwendige Interaktion zwischen dem Fc γ RIII Rezeptor auf den NK-Zellen und der Fc-Region des *Targeted RNase*-Fusionsproteins durch die C-terminale Fusion der RNase sterisch behindert wird, obwohl die essentiellen Kontaktflächen zwischen Fc und Fc γ RIII innerhalb der C_H2- und der hinge-Region lokalisiert ist (Sondermann *et al.* 2000).

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass das α CD30-scFv-Fc-Konstrukt, ohne die RNase-Fusion, in der Lage war, eine CD30-spezifische ADCC Aktivität zu vermitteln. Dies lies sich in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduzieren, wobei die maximale prozentuale Zytotoxizität im Bereich von 50% bis 80% lag. Die Spanne zwischen den Maximalwerten, kann auf die separate Aufarbeitung von Blutspenden verschiedener Patienten, als Quelle für die Effektorlymphozyten (PBMC bzw. NK-Zellen), zurückgeführt werden. Die isolierten Effektorzellen können somit schon von vornherein zu unterschiedlicher ADCC befähigt sein (Liljefors *et al.* 2003). Zusätzlich ist auf die getrennte Stimulierung der isolierten PBMC mit humanem IL-2 hinzuweisen.

Weiterhin ist die charakteristische Abhängigkeit der Zytotoxizität von dem Effektor- zu Zielzellen Verhältnis vorhanden, mit einer maximalen Zytotoxizität im Verhältnis 100:1. Der Befund für die ADCC-Aktivität des scFv-Fc Antikörperfragments unterstreicht den inhibierenden Einfluss der RNase auf die ADCC-Aktivität der *Targeted RNase*.

4.3 Neue „single chain“ Antikörperformate - scFab Δ C und sclgG

Die Nachteile existierender Antikörperformate liegen im Bereich der Stabilitätseigenschaften (Aggregationstendenz bei scFv-Molekülen) und falscher Kettenpaarungen bei Fab und IgG Antikörpern (Bence Jones Proteine bestehend aus LC-Homodimeren). Zusätzlich erfordern bestehende monocistronische Antikörperexpressionssysteme eine zweite Initiation der Transkriptionsmaschinerie bzw. in Fällen bicistronischer Expression eine erneute Initiation

des Translationsapparates mit u.U. variierender Translationseffizienz. Zur Umgehung dieser Nachteile wurde das Repertoire an einzelsträngigen Polypeptid-Antikörpern um die Formate scFab Δ C und sclgG erweitert. Ein weiterer Vorteil der neuen Antikörperformate ist die leichtere Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien bzw. Hefeklone, da nur eine Genintegration notwendig ist.

Das scFv-Format, bestehend aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Antikörperkette, die über einen flexiblen Peptidlinker kovalent miteinander verbunden sind, wurde erstmals 1988 von Bird *et al.* generiert. Der Linker bei scFv-Antikörpern beträgt meistens zwischen 15 Aminosäuren beim Glycin-Serin-Linker [(Gly₄-Ser)₃] und 18 Aminosäuren beim Yol-Linker (Breitling und Little 1986), entsprechend der erforderlichen Linkerlänge für die Fusion von V_L und V_H bzw. umgekehrt. Die Fusion der leichten mit der schweren Kette eines Fab-Fragments erfordert aufgrund der größeren Distanz zwischen dem C- und N-Terminus beider Ketten längere Linkerpeptide. Die Entfernung des C-Terminus der leichten Kette zum N-Terminus der schweren Antikörperkette wurde anhand des Strukturmodells von D1.3 Fab berechnet (Fischmann *et al.* 1991). Eine Linkerlänge von 34 Aminosäuren sollte eine korrekte Assoziation beider Ketten ermöglichen und die Ausbildung der Antigenbindungsstelle nicht behindern.

Als Expressionssystem für die D1.3 Antikörperformate scFab Δ C und sclgG wurde zunächst *P. pastoris* gewählt, da es sich wegen der Verwendung von wahlweise Komplex- oder Minimalmedium, durch eine schnellere Generierung stabiler Klone, eine kurze Generationszeit und eine hohe Sekretionsleistung auszeichnet. Kürzlich veröffentlichte Erfolge über die erstmalige Expression eines kompletten IgG mit humanem N-Glykosylierungsmuster in genetisch modifizierten *P. pastoris*-Stämmen unterstreichen das Potential dieses Expressionssystems (Li *et al.* 2006), da humane Glykosylierungsmuster für die weiteren Effektorfunktionen (CDC, Interaktion mit Fc γ R) von Antikörpern essentiell sind (Ferrara *et al.* 2006).

Die Produktion des D1.3-scFab Δ C-Antikörpers in *P. pastoris* ergab eine Ausbeute von 700 μ g/L. Ein sehr geringer Teil der aufgereinigten Antikörperfraktion enthielt Degradationsprodukte des scFab Δ C mit ~25 kDa. Die weitere Analyse mittels Gelfiltration ergab, dass in der aufgereinigten scFab Δ C-Fraktion ein sehr heterogenes Gemisch an Monomeren, Dimeren und Multimeren vorlag. Ursache für die Aggregation können u.a. konformationelle Veränderungen der nativen Proteinfaltung sein, in deren Folge vor allem exponierte unpolare Aminosäureseitenketten zur Aggregation beitragen (Vetri und Militello 2005).

Die geringe Bindung des scFab Δ C-Monomers im Antigen-ELISA ist möglicherweise auf den mit 34 Aminosäuren zu kurzen Peptidlinker zurückzuführen, da sich die Dimer-Fraktion im ELISA als funktionell erweist. Dieses Phänomen ist bereits bei scFv-Fragmenten bekannt,

die sich bei einer Verkürzung des Linkers zu Dimeren zusammenlagern. Dies wird für die Erzeugung von bivalenten oder bispezifischen scFv-Dimeren genutzt (Schier *et al.* 1996). Ob eine Verlängerung des Peptidlinkers über 34 Aminosäuren hinaus den beiden fusionierten Antikörperketten die erforderliche Flexibilität verleiht, um das Verhältnis der Proteinausbeute zugunsten funktioneller Monomere zu verlagern, wurde nicht untersucht. Nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand im Hinblick auf die Tendenz zur Dimerisierung bzgl. des scFab Δ C Formats ist prinzipiell auch eine Verwendung als bivalenter Fab-Dimer oder bei entsprechendem Einsatz von Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität der antigenerkennenden Domänen als bispezifischer Fab-Dimer denkbar, wie dies für scFv-Fragmente bereits berichtet wurde (Schier *et al.* 1996).

Bei der Expression des D1.3-sclgG in *P.pastoris* führte die Protease-Aktivität während der Kultivierung zur vorzeitigen Spaltung des sclgG in der C-terminalen C_H1-Domäne an Position 464 (Arg) und in der hinge-Region an Position 473 (Lys). Die Spaltungen an den Positionen R464 und K473 entsprechen typischen Spaltstellen der Aspartylprotease bei basischen Aminosäuren (Shapiro *et al.* 2003). Die Mutagenese der Proteasespaltstellen durch gezielte Punktmutation zum Austausch gegen nicht-basische Aminosäuren, vorzugsweise gegen Glycin oder Serin, oder der Einsatz eines Aspartylprotease-defizienten *P. pastoris* Stamms, wie SMD1168 (*pep4*), könnte die Degradation des sclgG in *P. pastoris* unterdrücken. Für andere Fc-basierte rekombinante Proteine ist eine derartige Spaltung der hinge-Region bei der Expression in *P. pastoris* ebenfalls berichtet worden (Shapiro *et al.* 2003). Eine Deletion der Proteasespaltstelle durch Mutagenese führte zu einer 80% Verringerung der Proteindegradation.

Parallel erfolgte die transiente Expression des sclgG im Säugerzellexpressionssystem HEK 293T. Das aus dem Zellkulturüberstand affinitätschromatographisch gereinigte sclgG-Protein wies keine Degradation durch Proteaseaktivität auf, da bei der Ermittlung der molaren Masse im reduzierenden SDS-Gel außer der erwarteten 75-kDa Bande keine weiteren Degradationsbanden sichtbar waren. Die Analyse des sclgG-Proteins im nichtreduzierenden SDS-Gel wies ein für Antikörper charakteristisches Laufverhalten mit knapp über 250 kDa auf (Li *et al.* in press). Die analytische Gelfiltration wurde zur Bestimmung der Molmassen der gelösten nativen sclgG-Moleküle und seiner Aggregate eingesetzt und wies ca. 80% sclgG-Monomere aus zwei sclgG-Ketten auf, die sich durch intermolekulare Disulfidbrücken in der hinge-Region ausbilden und eine molare Masse von 150 kDa aufweisen. Bei der Überprüfung der Funktionalität im Antigen-ELISA auf Lysozym, zeigten die sclgG-Monomere und die größere Aggregate des sclgG eine nahezu vergleichbare Antigenbindung.

Um Aufschluss über die eventuelle Beeinträchtigung des Peptidlinkers auf die Bindungseigenschaften des sclgG zu erhalten, wurde die über Gelfiltration isolierte

Monomerfraktion mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Die Auswertung der aufgenommenen Sensogramme (Abb. 3.25) zeigte, dass die Affinität des sclgG mit $K_D = 176 \text{ pM}$ und dessen Assoziations- bzw. Dissoziationsrate ($k_{on} = 2,62 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 4,62 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) mit denen des ursprünglich murinen D1.3 mAk mit pM-Affinität nahezu übereinstimmt (Goldbaum *et al.* 1999). Falls ein Einfluss des Peptidlinkers auf die Konformation bzw. auf die Affinität des sclgG vorliegt, so ist dies zumindest im Fall des D1.3-sclgG von nachrangiger Bedeutung für die Bindungseigenschaften des rekombinanten Antikörperformats.

Der Unterschied zwischen den beiden *single chain*-Antikörperformaten in der Bildung von Aggregaten und deren Funktionalität war nicht abzusehen. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Expressionen (scFab Δ C-*P.pastoris* / sclgG-Mammalia) ist aufgrund der verschiedenen Expressionssysteme, trotz deren Ähnlichkeit in der Organisation des Sekretionsapparates, nur sehr bedingt möglich.

Die sclgG-Produktion ist in einem homologen Säugerzellexpressionssystem vorteilhaft im Hinblick auf Proteinfaltung bzw. Funktionalität, wobei Chaperone, wie das im ER-lokalisierte „Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein“ (BiP) eine wesentliche Rolle bei der Faltung und Zusammensetzung sekretorischer multimerer Proteine spielen. Es bindet dabei vorzugsweise an hydrophobe Regionen unvollständig gefalteter, naszierender Polypeptidketten. Bei der Sekretion von Immunglobulinen bindet BiP an die schwere Kette und hält die Moleküle im ER zurück. Erst bei einer korrekten Assemblierung des kompletten IgG löst sich BiP von dem Molekül der schweren Kette. Bindungsstellen von BiP verteilen sich über fast alle Domänen der schweren Kette: V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} (Knarr *et al.* 1995), allerdings dominiert die Bindung von BiP an C_{H2} . Die Bindung von BiP an die leichte Kette des Immunglobulins ist von sehr schwacher Natur, so dass die leichten Ketten in ihrer freien Form oder als Homodimere (Bence-Jones Proteine) sekretiert werden können. Im Fall der *single chain*-Antikörper wird dieser Effekt aufgrund der Fusion beider Antikörperketten unterbunden.

Im Gegensatz dazu kann bei der heterologen Proteinexpression von scFab Δ C in *P.pastoris* eine Überlastung des wirtseigenen Proteinfaltungsapparates nicht ausgeschlossen werden, was ein nicht natives Faltungsmuster zur Folge haben kann. Die Favorisierung einer nicht-nativen Konformation von scFab Δ C bei der Expression in *P.pastoris* wäre eine mögliche Erklärung, warum die Länge des Peptidlinkers bei den scFab Δ C-Molekülen zur Dimerbildung beiträgt, hingegen bei der Expression des sclgG in Mammaliazellen sich die leichte und schwere Kette entsprechend ihrer nativen Konformation anordnen und funktionelle Monomere ausbilden. Die genaue Ursache dieses Sachverhalts ist nicht ausreichend geklärt und bedarf daher der weiteren Untersuchung.

Es bleibt festzuhalten, dass die Produktion von Lysozym spezifischen D1.3-sclgG im Säugerzellexpressionssystem erfolgreich war und die Eigenschaften des neuen Antikörperformates, zumindest im Punkt der appararenten Affinität sowie der Assoziations- und Dissoziationsrate, denen des monoklonalen D1.3 IgG vergleichbar waren.

4.4 Ausblick

Das im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit *in vitro* validierte Konzept der Targeted-RNase, für den bei Hodgkinlymphomen und zwei weiteren Unterarten von Nicht-Hodgkin Lymphomen vorkommenden charakteristischen Tumormarker CD30, stellt aufgrund des vollständig humanen Ursprungs sämtlicher Bestandteile des eingesetzten Antikörper-RNase Fusionsproteins einen Fortschritt in der Entwicklung humaner antikörperbasierter Krebstherapeutika dar.

Es sind noch Studien erforderlich, die die *in vivo*-Wirksamkeit des TR-Konstruktes α CD30-scFv-Fc-RNase belegen. Für die Durchführung der Versuche steht bereits ein CD30-Tumor Mausmodell mit CD30-positiven T/SA-Tumorzellen transfizierten, immunokompetenten Mäusen zur Verfügung. Aufgrund des modularen Aufbaus des TR-Konstrukts (α CD30-scFv-Fc-RNase) ist ein Austausch des scFv-Fragments möglich. Eine Erweiterung des Anwendungsspektrums des TR-Konstrukts ist auf andere internalisierende Tumormarker, wie CD22 bei malignen B-Zell- Lymphomen, Mammakarzinom assoziiertes Muc1 und erbB2/Her2 sowie CD33 für maligne Myeloblastomzellen bei akuter myeloischer Leukämie, möglich (Shan und Press 1995, Henderikx *et al.* 2002, Earp *et al.* 1995, Linenberger 2005). Weiterhin ist die Erzeugung einer noch katalytisch potenteren humanen pankreatischen RNase mittels Mutagenese denkbar, wobei die Entstehung neuer immunogener Epitope nicht außer Acht gelassen werden darf. Die in dieser Arbeit verwendete verkürzte Version der humanen RNase1, mit der Deletion von 4 Aminosäuren des C-terminalen Endes, bewirkte eine erhöhte Temperaturstabilität und Ribonukleaseaktivität gegenüber der nativen RNase1 (Bal und Batra 1997).

In Abhängigkeit von der Art des Tumors (solide oder hämatologisch) ist es möglich, den Anforderungen entsprechende *Targeted RNase*-Konstrukte mit angepasster Größe des Gesamtmoleküls unter Verwendung verschiedener Antikörperformate zu erzeugen, die über verbesserte pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften verfügen. Insbesondere falls Antikörperformate mit hinge- bzw. Fc-Region trotz der vorliegenden Daten zu ADCC weiterhin über Effektorfunktionen innerhalb der Fusionsmoleküle verfügen, eröffnet sich der Weg zur Modifikation der Serumhalbwertszeiten durch die Interaktion mit FcRn-Rezeptoren, und CDC-Reaktion. Diese Effektorfunktionen würden die *Targeted RNase*-

Krebstherapie innerhalb der Zeitspanne, in der die Fusionsmoleküle am Tumormarker gebunden, aber noch nicht internalisiert sind, unterstützen.

Als neue alternative Antikörperformate könnten „*single chain*“-Antikörperformate wie scFab Δ C- und scIgG-Formate eingesetzt werden. Sie könnten vorteilhaft hinsichtlich einer verbesserten Produktion von Antikörperfragmenten sein.

5 Zusammenfassung

Die zunehmende Bedeutung der antikörperbasierten Krebstherapie spiegelt sich in der stark gestiegenen Anzahl in klinischen Studien befindlicher monoklonaler Antikörper wider. Neben dem bisherigen Einsatz monoklonaler Antikörper stehen insbesondere Antikörperfusionen zur Funktionserweiterung im Mittelpunkt der Forschung. Ein Forschungsschwerpunkt konzentriert sich auf den Einsatz von RNasen als Fusionspartner der Antikörper. Das Prinzip der mittels Antikörper zielgerichtet geleiteten RNasen (*Targeted RNase*), beruht auf der antigenspezifischen Bindung an Oberflächenmarker von Tumoren, die zu rezeptor-vermittelter Endozytose befähigt sind. Nach Internalisierung muss eine Translokation ins Zytoplasma erfolgen, um die katalytische Funktion der RNase zur Inhibition des Proteinsyntheseapparates zu ermöglichen, die zum Tod der Zielzelle führt.

In dieser Arbeit wurde ein vollständig humanes Antikörper-RNase-Fusionsprotein erzeugt, das gegen den internalisierenden Tumormarker CD30 gerichtet ist. Als antigenspezifische Bindungsdomäne der TR-Konstrukte wurden unterschiedliche Antikörperformate (scFv, scFv-Fc, IgG) untersucht. Im Rahmen von BIAcore- und Durchflusszytometrie-Messungen stellte sich das scFv-Fc-Format mit einer apparenten Affinität von $\sim 9,8 \times 10^{-10} \text{ M}$ gegenüber dem scFv- und IgG-Format als überlegen heraus. Bei der Untersuchung der Auswirkung von der Antikörper-RNase-Fusion auf die RNase Aktivität zeigte sich, dass die C-terminale Fusion der RNase an die Fc-Domäne des CD30-spezifischen scFv-Fc die geringste Beeinträchtigung der RNase Aktivität verursachte. Zusätzlich war die humane pankreatische RNase gegenüber zytoplasmatisch ubiquitär vorhandenen RNasen-Inhibitoren nicht sensitiv, was dem *Targeted RNase*-Konzept zur Inhibierung der Proteintranslation entgegen wirken würde. Die Internalisierung des scFv-Fc-RNase-Konstruktes nach Bindung an CD30⁺ Karpas 299-Zellen wurde nachgewiesen. Außerdem wurde das Wachstum dieser CD30⁺ Zelllinie mit einer IC₅₀ von 3,3 nM gehemmt, was die *in vitro*-Wirksamkeit des TR-Konstrukts betätigte.

Außerdem wurden neue „single-chain“-Antikörperformate basierend auf dem Lysozym-spezifischen Antikörper D1.3 entwickelt, deren Einsatz auch im Rahmen des *Targeted RNase*-Konzepts denkbar ist. Erstmals wurden auf diese Weise sowohl scFabΔC als auch sclgG Antikörper erzeugt, wobei insbesondere sclgG Moleküle in ihrer charakteristischen Bindung dem murinen monoklonalen D1.3 IgG glichen.

Das im Rahmen dieser Arbeit erzeugte αCD30-scFv-Fc-RNase-Fusionskonstrukt ist das erste vollständig humane *Targeted RNase*-Konstrukt, das zur Behandlung von CD30⁺ Lymphomerkkrankungen dienen könnte. Das Spektrum an behandelbaren Krebs-erkrankungen kann im Rahmen des *Targeted RNase*-Konzepts durch den Austausch der Antigenbindungsdomäne des Antikörpers auf weitere internalisierende Tumormarker erweitert werden.

Summary

The increasing number of monoclonal antibodies tested in clinical trials for cancer reflects the growing importance of antibody-based cancer therapies. In addition to monoclonal antibodies, the focus of research shifts towards antibody fusion proteins to provide biological entities with additional functions. One of the main research areas concentrates on the usage of RNases for antibody fusion proteins. The principle is based on specific targeting of RNase (*Targeted RNase*) to cell surface markers of tumors which are capable of receptor mediated endocytosis. The specificity is provided by the antibody. The binding and internalization of the *Targeted RNase* is followed by its translocation into the cytoplasm to provide catalytic function of the RNase to inhibit the protein synthesis. Ultimately the inhibition leads to cell death.

The outcome of this work lead to the first fully human antibody-RNase fusion protein targeting the internalizing tumor marker CD30. Various antibody formats (scFv, scFv-Fc, IgG) were evaluated as antigen specific binding domain in TR-constructs. Surface plasmon resonance and FACS analysis revealed the superiority of the scFv-Fc format with an apparent affinity of $\sim 9,8 \times 10^{-10} \text{M}$. Investigating effects of antibody-RNase fusion on the RNase activity lead to the conclusion that the C-terminal fusion of RNase to the Fc domain of CD30 specific scFv-Fc is only of minor influence for RNase activity. Moreover, in the context of the scFv-Fc-RNase fusion human pancreatic RNase was not sensitive to ubiquitous cytoplasmatic RNase-inhibitor. Internalization of the TR-molecules binding to CD30⁺ Karpas 299 cells was proven. Finally growth of the CD30⁺ cell line could be inhibited with an IC_{50} of 3,3nM providing evidence for the *in vitro* function of the *Targeted RNase*.

New single chain antibody formats were additionally developed, which could also be engaged in TR-constructs. Antibody modelling was based on the D1.3 lysozyme specific antibody to generate scFab Δ C and sclgG antibody formats. Binding characteristics of the sclgG were comparable to those of murine monoclonal D1.3 IgG.

In summary, the generated αCD30 -scFv-Fc-RNase-fusion protein is the first fully human *Targeted RNase* construct possibly useful for treatment of CD30⁺ lymphomas. The *Targeted RNase* concept can be expanded to treat further cancer types by exchanging the antigen binding domain for antibodies targeting different internalizing tumor markers.

6 Literatur

Adams, G.P., und Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* 23, 1147-1157.

Arteaga, C.L. (2002). Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin. Oncol.* 29, 3-9.

Bagshawe, K. D. (1987). Antibody directed enzymes revive anti cancer prodrugs concept. *Br. J. Cancer* 56, 531-532.

Bal HP, Batra JK. (1997). Human pancreatic ribonuclease--deletion of the carboxyl-terminal EDST extension enhances ribonuclease activity and thermostability. *Eur J Biochem.* 245, 465-469.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 73, 431-445.

Bargou, R.C., Mapara, M.Y., Zugck, C., Daniel, P.T., Pawlita, M., Dohner, H., Dorken, B. (1993) Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med.*, 177, 1257-1268.

Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*. 1988, 242, 423-426.

Blackburn, P., Gavilanes, J.G. (1982). Identification of lysine residues in the binding domain of ribonuclease A for the RNase inhibitor from human placenta. *J Biol Chem.*, 257, 316-321.

Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardelt, W., Ladner, J., Youle, R.J. (1996). Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol.*, 257, 992-1007.

Borchmann P, Schnell R, Fuss I, Manzke O, Davis T, Lewis LD, Behnke D, Wickenhauser C, Schiller P, Diehl V, Engert A. (2002). Phase 1 trial of the novel bispecific molecule H22xKi-4 in patients with refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*, 100, 3101-3107.

Borchmann, P., Treml, J.F., Hansen, H., Gottstein, C., Schnell, R., Staak, O., Zhang, H.F., Davis, T., Keler, T., Diehl, V., Graziano, R.F., Engert, A. (2003). The human anti-CD30 antibody 5F11 shows in vitro and in vivo activity against malignant lymphoma. *Blood*, 102, 3737-3742.

Boyd, M., Ross, S.C., Dorrens, J., Fullerton, N.E., Tan, K.W., Zalutsky, M.R., Mairs, R.J. (2006). Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with alpha-, beta-, and auger electron-emitting radionuclides. *J Nucl Med.*, 47, 1007-1015.

Breitling, F., Little, M. (1986). Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J Mol Biol.*, 189, 367-370.

Breitling, F., Düberl, S. (1997). *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Carson, D.A., Freemark, B.D. (1986) Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. *Adv. Immunol.* 38, 275–311.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754-758.

Chang CH, Sapra P, Vanama SS, Hansen HJ, Horak ID, Goldenberg DM. (2005). Effective therapy of human lymphoma xenografts with a novel recombinant ribonuclease/anti-CD74 humanized IgG4 antibody immunotoxin. *Blood*, 106, 4308-4314.

Chen, S., Yu, L., Jiang, C., Zhao, Y., Sun, D., Li, S., Liao, G., Chen, Y., Fu, Q., Tao, Q., Ye, D., Hu, P., Khawli, L.A., Taylor, C.R., Epstein, A.L., Ju, D.W. (2005). Pivotal Study of Iodine-131–Labeled Chimeric Tumor Necrosis Treatment Radioimmunotherapy in Patients with Advanced Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 1538-1547.

Chester , K., Pedley, B., Tolner, B., Violet, J., Mayer, A., Sharma, S., Boxer, G., Green, A., Nagl, S., Begent, R. (2004). Engineering antibodies for clinical applications in cancer. *Tumor Biol.* 25, 91-98.

Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443-446.

Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D.J. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J.Clin. Oncol.* 17, 2639-2648.

daCosta, L., Renner, C., Hartmann, F., Pfreundschuh, M. (2000) Immune recruitment by bispecific antibodies for treatment of Hodgkin disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46, 33-36.

De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R., D'Alessio, G. (2004). A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res.*, 64, 4870-4874.

Deonarain MP, Epenetos AA. (1994). Targeting phosphodiesterases as a strategy for killing tumor cells. *Cell Biophys.*, 24, 249-257.

Diehl, V., Franklin, J., Paulus, U. (2001). BEACOPP chemotherapy with dose escalation in advanced Hodgkin's disease: final analysis of the German Hodgkin Lymphoma Study Group HD9 randomised trial. *Blood*, 98: 769 (Abstract)

Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., Golay, J. (2003). Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.* 171, 1581-1587.

Dürkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., Stein, H. (1992). Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*, 68, 421-427.

Earp, H.S., Dawson, T.L., Li, X., Yu, H. (1995). Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat.*, 35, 115-132.

Eiklid, K., Olsnes, S., Pihl, A. (1980). Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 126, 321-326.

Endo, Y., Wool, I. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 257, 9054-9060.

Engert, A., Diehl, V., Schnell, R., Radszuhn, A., Hatwig, M.T., Drillich, S., Schon, G., Bohlen, H., Tesch, H., Hansmann, M.L., Barth, S., Schindler, J., Ghetie, V., Uhr, J., Vitetta, E. (1997). A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89, 403-410.

Falini, B., Bolognesi, A., Flenghi, L., Tazzari, P.L., Broe, M.K., Stein, H., Durkop, H., Aversa, F., Corneli, P., Pizzolo, G. (1992). Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. *Lancet* 339, 1195-1196.

Falini, B., Pulford, K., Pucciarini, A., Carbone, A., De Wolf-Peeters, C., Cordell, J., Fizzotti, M., Santucci, A., Pelicci, P.G., Pileri, S., Campo, E., Ott, G., Delsol, G., Mason, D.Y. (1999). Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood*, 94, 3509-3515.

Ferrara C, Brunker P, Suter T, Moser S, Puntener U, Umana P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng.*, 93, 851-861.

Fischer, P., Nacheva, E., Mason, D.Y., Sherrington, P.D., Hoyle, C., Hayhoe, F.G., Karpas, A. (1988). A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood*, 72, 234-240.

Fischmann, T.O., Bentley, G.A., Bhat, T.N., Boulot, G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E., Tello, D., Poljak, R.J. (1991). Crystallographic refinement of the three-dimensional structure of the FabD1.3-lysozyme complex at 2.5-Å resolution. *J Biol Chem.*, 266, 12915-12920.

Foote, J. und Eisen, H. N. (1995). Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1254-1256.

Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., Introna, M. (2001) CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98, 3383-3389.

Goldbaum, F.A., Cauerhff, A., Velikovsky, C.A., Llera, A.S., Riottot, M.M., Poljak, R.J. (1999). Lack of significant differences in association rates and affinities of antibodies from short-term and long-term responses to hen egg lysozyme. *J Immunol.*, 162, 6040-6045.

Haigis, M.C., Raines, R.T. (2002). Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 116, 313-324.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363, 446-448.

Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H. (2000). CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF- α -converting enzyme. *J Immunol.*, 165, 6703-6709.

Hansen, H.P., Recke, A., Reineke, U., Von Tresckow, B., Borchmann, P., Von Strandmann, E.P., Lange, H., Lemke, H., Engert, A. (2004). The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J.*, 893-905.

Harper, J.W., Vallee, B.L. (1988). Mutagenesis of aspartic acid-116 enhances the ribonucleolytic activity and angiogenic potency of angiogenin. *Proc Natl Acad Sci.*, 85, 7139-7143.

Henderikx, P., Coolen-van Neer, N., Jacobs, A., van der Linden, E., Arends, J.W., Mullberg, J., Hoogenboom, H.R. (2002). A human immunoglobulin G1 antibody originating from an in vitro-selected Fab phage antibody binds avidly to tumor-associated MUC1 and is efficiently internalized. *Am J Pathol.* 160, 1597-1608.

Horning, S.J., Hoppe, R.T., Breslin, S. (2002). Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin's disease: mature results of a prospective clinical trial. *J Clin Oncol*, 20, 630–637.

Hoogenboom, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23, 1105-1116.

Hübinger, G., Müller, E., Scheffrahn, I., Schneider, C., Hildt, E., Singer, B.B., Sigg, I., Graf, J., Bergmann, L. (2001). CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene*, 20, 590-598.

Huhn, M., Sasse, S., Tur, M.K., Matthey, B., Schinkothe, T., Rybak, S.M., Barth, S., Engert, A. (2001). Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res.* 61, 8737-8742.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2002), *Immunobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 5. Auflage, Bremen.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.

Kim JS, Soucek J, Matousek J, Raines RT (1995). Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem* 270(52), 31097-102.

Knarr, G., Gething, M.-J., Modrow, S., and Buchner, J. (1995). BiP binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.* 270, 27589-27594.

Kneba, M., Dreger, P., Pantel, K. (2001). *Antikörper in der Hämatologie und Onkologie*. UNI-MED Verlag, 1.Auflage, Bremen.

Knecht, H., Bachmann, E., Brousset, P. (1993). Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 82, 2937–2942.

Kobe, B., Deisenhofer, J. (1996). Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J Mol Biol.*, 264, 1028-1043.

Kohler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.

Konisky, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu Rev Microbiol.* 36, 125-144.

Krauss J, Arndt MA, Vu BK, Newton DL, Seeber S, Rybak SM. (2005). Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 331, 595-602.

Lee, F.S., Shapiro, R., Vallee, B.L. (1989). Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* 28, 225–230.

Lee, J.H., Engler, J.A., Collawn, J.F., Moore, B.A. (2001). Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur J Biochem.* 268, 2004-2012.

Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T.A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B.K., Cook, W.J., Cukan, M., Houston-Cummings, N.R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S.R., Hoopes, J.P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, R., Nett, J.H., Rios, S., Strawbridge, R., Wildt, S., Gerngross, T.U.. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.*, 24, 210-215

Li, J., Menzel, C., Meier, D., Zhang, C., Dübel, S., Jostock, T. (2006). A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. In press.

Liljefors, M., Nilsson, B., Hjelm-Skog, A.L., Ragnhammar, P., Mellstedt, H., Frodin, J.E. (2003). Natural killer (NK) cell function is a strong prognostic factor in colorectal carcinoma patients treated with the monoclonal antibody 17-1A. *Int J Cancer*, 105, 717-723.

Linenberger, M.L. (2005). CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia*.19, 176-182.

Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol.*, 23, 1117-1125.

Mayer, A., Sharma, S.K., Tolner, B., Minton, N.P., Purdy, D., Amlot, P., Tharakan, G., Begent, R.H., Chester, K.A. (2004). Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Br. J. Cancer* 90, 2402-2410.

Merion M, Schlesinger P, Brooks RM, Moehring JM, Moehring TJ, Sly WS (1983). Defective acidification of endosomes in Chinese hamster ovary cell mutants "cross-resistant" to toxins and viruses. *PNAS* 80, 5315-5319.

Nadali, G., Vinante, F., Chilosi, M., Pizzolo, G. (1997). Soluble molecules as biological markers in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*, 26 Suppl 1, 99-105.

Nerl, C., Abedinpour, F., Dreyling, M., Hentrich, M. (2004). Periphere T-Zell-Lymphome. *MANUAL Maligne Lymphome*, 117-125.

Pappenheimer, A.M. (1977). Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 69-94.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*, 77, 7415–7419.

Raghavan, M., Bjorkman, P.J. (1996). Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12, 181-220.

Roth, J. (1963). Ribonuclease activity and cancer: a review. *Cancer Res.* 23, 657-666.

Roth, J.S., Hurley, D. (1966). The reaction of ribonuclease inhibitor with modified ribonucleases. *Biochem J.*, 101, 112-119.

Roupas, P., Herington, A.C. (1987). Receptor-mediated endocytosis and degradative processing of growth hormone by rat adipocytes in primary culture. *Endocrinology* 120, 2158-2165.

Rybak, S.M., Saxena, S.K., Ackerman, E.J., Youle, R.J. (1991), Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *J Biol Chem.*, 266, 21202-21207.

Saxena, S.K., Rybak, S.M., Davey, R.T. Jr, Youle, R.J., Ackerman, E.J. (1992). Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *J Biol Chem.*, 267, 21982-21986.

Schellekens, H. (2005). Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant.*, 20, 3-9.

Schier R, Bye J, Apell G, McCall A, Adams GP, Malmqvist M, Weiner LM, Marks JD. (2006). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol.*, 255, 28-43.

Schnell R, Dietlein M, Staak JO, Borchmann P, Schomaecker K, Fischer T, Eschner W, Hansen H, Morschhauser F, Schicha H, Diehl V, Raubitschek A, Engert A. (2005). Treatment of refractory Hodgkin's lymphoma patients with an iodine-131-labeled murine anti-CD30 monoclonal antibody. *J Clin Oncol.*, 23, 4669-4678.

Schrama, D., Reisfeld, R.A., Becker, J.C. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature Reviews* 5, 147-159.

Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299, 65-67.

Senter, P.D. (2001). Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Adv. Drug Del. Rev.* 53, 247-264.

Shan, D., Press, O.W.(1995). Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. *J Immunol.* 154, 4466-4475.

Shapiro, R.I., Wen, D., Levesque, M., Hronowski, X., Gill, A., Garber, E.A., Galdes, A., Strauch, K.L., Taylor, F.R. (2003). Expression of Sonic hedgehog-Fc fusion protein in *Pichia pastoris*. Identification and control of post-translational, chemical, and proteolytic modifications. *Protein Expr Purif.*, 29, 272-283.

Sharma, S.K., Pedley, R.B., Bhatia, J., Boxer, G.M., El-Emir, E., Qureshi, U., Tolner, B., Lowe, H., Michael, N.P., Minton, N., Begent, R.H., Chester, K.A. (2005). Sustained tumor regression of human colorectal cancer xenografts using a multifunctional mannosylated fusion protein in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Clin Cancer Res.* 11, 814-825.

Smith, S.L. (1996). Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J Transpl Coord.*, 6, 109-119.

Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. (2000). The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature*, 406, 267-273.

Sorrentino, S., Libonati, M. (1994). Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch Biochem Biophys.*, 312, 340-348.

Suzuki, M., Saxena, S., Boix, E., Prill, R., Vasandani, V., Ladner, J.E., Sung, C., Youle, R.J. (1999). Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nature Biotechnology* 17, 265-270.

Theuer, C.P., FitzGerald, D.J., Pastan, I. (1993). A recombinant form of *Pseudomonas* exotoxin A containing transforming growth factor alpha near its carboxyl terminus for the treatment of bladder cancer. *J. Urol* 149, 1626-1632.

Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Oshimura, M., Ishida, I. (2000) Double transchromosomal mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing immunoglobulin heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 722-727.

Van Ness, B.G., Barrowclough, B., Bodley, J.W. (1980). Recognition of elongation factor 2 by diphtheria toxin is not solely defined by the presence of diphthamide. *FEBS Lett.* 120, 4-6.

Vallera, D.A., Todhunter, D.A., Kuroki, D.W., Shu, Y., Sicheneder, A., Chen, H. (2005). A bispecific recombinant immunotoxin, DT2219, targeting human CD19 and CD22 receptors in a mouse xenograft model of B-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.*, 11, 3879-3888.

Vetri, V., Militello, V. (2005). Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin. *Biophys Chem.*, 113, 83-91.

Ward, E.S. (1995). VH shuffling can be used to convert an Fv fragment of anti-hen egg lysozyme specificity to one that recognizes a T cell receptor V alpha. *Mol Immunol.*, 32, 147-156.

Wei, M.L., Bonzelius, F., Scully, R.M., Kelly, R.B., Herman, G.A. (1998). GLUT4 and transferring receptor are differentially sorted along the endocytic pathway in CHO cells. *J Cell Biol.*, 140, 565-575.

Wu, Y., Mikulski, S.M., Ardelt, W., Rybak, S.M., Youle, R.J. (1993). A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem.*, 268, 10686-10693.

Yung L, Linch D. (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, 361, 943-951.

7 Anhang

7.1 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

7.1.1 Medien

LB-Medium:

10 g Trypton

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

ggf. 15 g Agar

ad 1 l ddH₂O, pH 7,0 einstellen

2xTY Medium:

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ggf. 15 g Agar

ad 1 l ddH₂O, pH 7,0 einstellen

YPD:

1% Hefe-Extrakt

2% Pepton

ad 900 mL ddH₂O, autoklaviert

ggf. 15 g Agar

ad 100 mL 20% Glucose, autoklaviert

BMGY

1% Hefe-Extrakt

2% Pepton

100 mM K-PO₄ Puffer, pH 6,0

1,34% Yeast Nitrogen Base (YNB)

4x10⁻⁵% Biotin

1% Glycerol

BMMY:

1% Hefe-Extrakt

2% Pepton

100 mM K-PO₄ Puffer, pH 6,0

1,34% YNB

4x10⁻⁵% Biotin

1% Methanol

7.1.2 Antibiotika

Stammlösungen:

Ampicillin und Kanamycin: 1 g / 20 mL, sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20° C lagern

Zeocin: 100mg/mL, sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20° C lagern

Arbeitskonzentrationen:

Ampicillin: 100 µg/mL

Zeocin: 25 µg/mL bei *E. coli* bzw. 100µg/mL bei *P. pastoris*

7.1.3 Standardpuffer und -lösungen

PBS:

8,0 g NaCl₂

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄ Dihydrat

0,24 g KH₂PO₄

ad 1 L ddH₂O, pH 7,4

Erythrozyten-Lysepuffer:

8,3 g NH₄Cl

1,0 g KHCO₃

1,8 mL of 5% EDTA

ad 1 L, autoklaviert

HEPES für Biacore-Analyse:

10 mM HEPES pH 7,4

0,15 M NaCl

3 mM EDTA

0,005% Detergenz P20

50x TAE-Puffer:

242 g Tris

57,1 mL Eisessig

100 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1 L ddH₂O

Phenol/Chloroform: 1 Vol. Phenol äquibriert in Tris/HCl pH 8,0

1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol 24/1 (v/v)

7.2 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

7.2.1 Kompetente Zellen

TFB1-Puffer:

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM K-Acetat

10 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerol

in ddH₂O, pH 5,8 (Essigsäure)

sterilfiltriert; Lagerung bei 4° C

TFB2-Puffer:

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerol

in ddH₂O, pH 8,0 autoklaviert;

Lagerung bei 4° C

7.2.2 Agarosegelelektrophorese

6x Ladepuffer:

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanolblau

30 % (v/v) Glycerol

10 mM EDTA

in ddH₂O

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/mL in ddH₂O, kühl lagern

7.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

7.3.1 ProteinA-Affinitätschromatographie

Waschpuffer:

0,1 M Citratpuffer pH 5

Elutionspuffer:

0,1 M Citratpuffer pH 2,6

Neutralisationspuffer:

2 M Tris pH 9,0

7.3.2 ProteinL-Affinitätschromatographie

Elutionspuffer:

0,1 M Glycin pH 2,5

Neutralisationspuffer:

2 M Tris pH 9,0

7.3.3 SDS-PAGE

4x Lower Tris:

1,5 M Tris in ddH₂O,

pH 8,8 mit HCl, filtrieren

4x Upper Tris:

0,5 M Tris in ddH₂O,

pH 6,8 mit HCl, filtrieren

10x Tris/Glycin:

75 g Tris

360 g Glycin

ad 2,5 l ddH₂O

(Oberer) Laufpuffer:

100mL 10x Tris/Glycin

4 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0

10 mL 10 % (w/v) SDS

ad 1 l ddH₂O

5x SDS-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerol

3,5 % (w/v) SDS

15 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,02 % (w/v) Bromphenolblau

7.3.4 Coomassie-Färbung

Gelfärber:

25 % (v/v) Isopropanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,5 % (w/v) Coomassie Blau G-250

Entfärber:

25 % (v/v) Isopropanol

10 % (v/v) Essigsäure

7.3.5 Western Blot / Immunostaining

Transferpuffer:

0,025 M Tris/HCl

0,192 M Glycin

10 % (v/v) Methanol

Ponceau-S-Lösung:

0,2% Ponceau-S (Sigma)

3% Trichloressigsäure

PBS-M / Blockierungslösung:

1x PBS

5 % (w/v) Milchpulver

Substratpuffer:

100 mM Tris/HCl pH 9,5

0,5 mM MgCl_2

NBT:

30 mg NBT

ad 1 mL 70% Dimethylformamid

BCIP:

15 mg BCIP

ad 1 mL 100% Dimethylformamid

7.3.6 ELISA

Coating-Puffer:

50 mM NaHCO_3 , pH 9,6

Blockierlösung:

PBS-FCS (10%)

TMB-Substratlösung

TMB Peroxidase EIA Substrat Kit

Stopplösung

1 M H_2SO_4